

**EFFET DE LA DISSOLUTION DES OXYDES DE FER
INDUITE PAR LES SIDÉROPHORES SUR LA
SOLUBILISATION DU PHOSPHORE DANS LES SOLS**

PIRLOT CLÉMENCE

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2018-2019

(CO)-PROMOTEUR(S): JEAN-THOMAS CORNÉLIS ET PHILIPPE JACQUES

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT.

**EFFET DE LA DISSOLUTION DES OXYDES DE FER
INDUITE PAR LES SIDÉROPHORES SUR LA
SOLUBILISATION DU PHOSPHORE DANS LES SOLS**

PIRLOT CLÉMENCE

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2018-2019

(CO)-PROMOTEUR(S): JEAN-THOMAS CORNÉLIS ET PHILIPPE JACQUES

Remerciements

À la fin de mon travail de fin d'études, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et à la réussite de mes cinq années au sein de Gembloux Agro-Bio Tech.

Tout d'abord, je voudrais remercier mon promoteur, le professeur Jean-Thomas Cornélis ainsi que mon co-promoteur, le professeur Philippe Jacques pour m'avoir permis de réaliser mon travail de fin d'études au sein de l'axe Echanges Eau-Sol-Plantes et du laboratoire « Microbial Processes and Interactions (MiPI)» de l'unité de recherche Terra. Je les remercie pour le temps qu'ils m'ont consacré ainsi que pour leurs conseils judicieux et leurs enthousiasmes pour mon travail.

Je tiens ensuite à adresser un grand remerciement à Adrien Anckaert qui a rendu la réalisation de ce travail possible. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée au niveau des manipulations, de la réflexion et de la relecture de ce travail ainsi que pour tes nombreux conseils, tes encouragements et ta gentillesse.

Je remercie également Cathy pour sa bonne humeur au laboratoire et son aide dans les manipulations, Romain pour le temps consacré au passage de mes échantillons à l'UPLC-MS, Benoit pour son assistance à la réalisation de mes solutions ainsi qu'à la stérilisation du matériel utilisé et Samuel pour son aide avec les bioréacteurs. Merci également à Felix Detombeur et à Catherine Henrist pour leur assistance durant les analyses MEBE-FEG.

Un tout grand à Clémence Bruwier pour son soutien, ses encouragements et sa présence durant l'ensemble de l'année et plus particulièrement durant le TFE ainsi que pour ses données sur l'essai centenaire.

Merci à tous les Tfistes du Terra et du GP, et plus particulièrement à Oriane et Farah, pour l'ambiance de travail toujours agréable, les nombreuses pauses-café ainsi que le soutien mutuel durant ses 6 mois de TFE.

Un merci particulier à l'ensemble de mes amis de Gembloux qui ont rendu ces cinq années d'études inoubliables. Un merci particulier à Vladimir, Tanguy, Sarah, Alizé, Lise, Yasmine, Quentin, Nico et Jonathan avec qui j'ai construit de précieux souvenirs et vécu de nombreuses expériences exceptionnelles.

Enfin, je remercie profondément ma famille de m'avoir permis de réaliser mes études à Gembloux mais également de m'avoir toujours soutenue, écoutée et conseillée durant l'ensemble de mes études.

Résumé

Les déficiences en phosphore représentent une contrainte majeure à la production optimale des cultures. De plus, les fertilisants phosphatés ont une très faible efficacité en raison d'une fixation rapide du phosphore par les particules du sol. La majorité du phosphore s'accumule dans les sols sous forme indisponible pour les plantes. Les oxydes de fer, dont la goethite, ont une grande capacité d'adsorption et influencent fortement la disponibilité du phosphore. Afin d'acquérir le fer, certains micro-organismes produisent des sidérophores, ligands organiques présentant une grande spécificité du fer. De nombreuses études démontrent l'influence des sidérophores sur la dissolution d'oxydes de fer variés. Ce travail est consacré à l'étude de l'effet de la dissolution de la goethite induite par les sidérophores, en particulier la pyoverdine, sur la co-solubilisation des ions phosphates, initialement adsorbés à la surface de la goethite. Pour ce faire, de la goethite synthétique a été mise en contact avec une solution de pyoverdine de *Pseudomonas putida BTP1* ainsi qu'avec des solutions d'oxalate et d'ascorbate à pH 6 et 8 durant 8, 12 et 24 h. Les résultats ont montré que la solution de pyoverdines permet une dissolution efficace de la goethite ainsi qu'une co-solubilisation du phosphore à des pH compris entre 6 et 8. De plus, l'efficacité des pyoverdines à dissoudre la goethite diminue avec l'augmentation du pH ainsi qu'en présence d'ions phosphates à la surface de la goethite. Cependant, la co-solubilisation du phosphore est plus élevée avec l'augmentation du pH, montrant que d'autres mécanismes entrent en jeu dans la solubilisation du phosphore. Les pyoverdines, et plus généralement les sidérophores, pourraient constituer une des stratégies envisageables à la mobilisation des formes de phosphore indisponible dans les sols.

Abstract

Phosphorus deficiency is a severe constraint to optimal crop production. In addition, phosphate fertilizers have a very low efficiency due to rapid fixation by soil particles. Most of the phosphorus accumulates in the soil into unavailable forms for plants. Iron oxides, including goethite, have a high adsorption capacity and strongly influence the availability of phosphorus. In order to acquire iron, some microorganisms produce siderophores, organic ligands with a high affinity and specificity for iron. Many studies show the influence of siderophores on the dissolution of various iron oxides. This work is devoted to the study of the effect of the dissolution of goethite induced by siderophores, in particular pyoverdine, on the co-solubilization of phosphate ions, initially adsorbed on the surface of goethite. To do this, synthetic goethite was put in contact with a pyoverdine solution of *Pseudomonas putida BTP1* as well as oxalate and ascorbate solutions at pH 6 and 8 for 8, 12 and 24 hours. The results showed that pyoverdine solution allows effective dissolution of goethite and co-solubilization of phosphorus at pH values between 6 and 8. In addition, the efficiency of pyoverdines in dissolving goethite decreases with increasing pH and in the presence of phosphate ions on the surface of goethite. However, co-solubilization of phosphorus is higher with increasing pH, showing that other mechanisms are involved in phosphorus solubilization. Pyoverdines, and more generally siderophores, could be a potential strategy for mobilizing unavailable forms of phosphorus in soils.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract.....	ii
Table des figures.....	vi
Table des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
I. Introduction.....	1
II. État de l'art.....	3
1. Phosphore dans les sols.....	3
1.1. Cycle biogéochimique du phosphore.....	3
1.2. Importance du phosphore chez les organismes vivants.....	4
1.3. Stock de phosphore biodisponible.....	5
1.4. Stock de phosphore indisponible.....	5
2. Fer dans les sols	6
2.1. Cycle biogéochimique du fer	6
2.2. Importance du fer chez les organismes vivants	7
2.3. Quantité de fer présent dans les sols.....	8
3. Oxydes de fer.....	8
3.1. Différents oxydes de fer au sein des sols.....	8
3.2. Proportion des oxydes de fer dans les sols	8
3.3. Propriétés des oxydes de fer	9
3.4. Solubilité des oxydes de fer	10
3.5. Adsorption et désorption du phosphore.....	10
4. Cortège microbien des sols.....	12
4.1. Acclimatation des micro-organismes aux carences minérale	12
4.2. Mobilisation du phosphore.....	13
4.3. Mobilisation du fer	16
5. Sidérophores	19
5.1. Diversité.....	20
5.2. Mécanisme d'action.....	21
5.3. Dissolution des oxydes de fer	22
6. Bactéries du genre Pseudomonas.....	23
6.1. Pyoverdine.....	24
6.2. Souche BTP1	26

III.	Objectifs	28
IV.	Matériels et méthodes	29
1.	Production, caractérisation et préparation de la goethite	29
1.1.	Production de goethite	29
1.2.	Caractérisation de la goethite	30
1.3.	Préparation de la goethite.....	31
1.4.	Détermination de la composition élémentaire de la goethite	32
2.	Production et caractérisation des solutions de sidérophores	33
2.1.	Souche, milieux et cultures	33
2.2.	Dosage de la concentration en cellules et en pyoverdine	34
2.3.	Détermination du poids des cellules de la souche BTP1	34
2.4.	Analyse par UPLC-MS.....	35
2.5.	Production de solution de surnageant sans sidérophore.....	36
2.6.	Expérience cinétique en fioles.....	37
2.7.	Expérience cinétique en bioréacteur	37
2.8.	Production finale de pyoverdine	38
2.9.	Détermination de la force ionique des milieux.....	38
3.	Dissolution de la goethite et de co-solubilisation du phosphore.....	39
3.1.	Test de dissolution de la goethite.....	39
3.2.	Expérience finale de dissolution de la goethite et de co-solubilisation du phosphore.	39
3.3.	Analyses statistiques	40
V.	Résultats et discussion	41
1.	Production, caractérisation et préparation de la goethite	41
1.1.	Production de goethite	41
1.2.	Caractérisation de la goethite	42
1.3.	Adsorption des ions phosphates.....	46
1.4.	Composition élémentaire	48
2.	Production et caractérisation des solutions de pyoverdine	49
2.1.	Production d'une solution de surnageant sans pyoverdine.....	49
2.2.	Détermination du poids des cellules de BTP1	54
2.3.	Expérience cinétique en fioles.....	55
2.4.	Expérience cinétique en bioréacteur	56
2.5.	Production de pyoverdine en fioles	58
2.6.	Détermination de la force ionique	58
3.	Test de dissolution de la goethite	59
4.	Dissolution de la goethite et co-solubilisation du phosphore.....	60

4.1.	Dissolution de la goethite	61
4.2.	Solubilisation du phosphore	66
4.3.	Co-solubilisation du fer et du phosphore.....	68
5.	Réponses aux besoins des plantes.....	71
VI.	Conclusion et perspectives	73
	Bibliographie.....	76

Table des figures

Figure 1. Cycle biogéochimique du phosphore des écosystèmes terrestres, tirée de (Vendramini et al., 2007).....	3
Figure 2. Teneur moyenne en phosphore biodisponible (mg P.100 g ⁻¹ de terre sèche) au niveau de l'horizon 0-25 cm des terres de cultures en Région wallonne de 1998 à 2002. ASBL REQUASUD, tirée de (Genot et al., 2009).....	5
Figure 3. Différents mécanismes induits par les organismes vivants permettant d'augmenter la disponibilité du phosphore ou la capacité des plantes à l'acquérir dans les sols, tirée de Richardson et al., 2011	13
Figure 4. Différents mécanismes induits par les organismes vivants engendrant une augmentation de la solubilisation et de la disponibilité du fer dans les sols, tiré de Robin et al., 2008	16
Figure 5. Différentes structures chélatantes présentes au niveau des sidérophores (Raines et al., 2015).	21
Figure 6. Représentation a) de la réaction de complexation entre un sidérophore hydroxamate et catécholates avec un ion ferrique et b) du mécanisme d'action des sidérophores excrétés par les bactéries du sol en présence de la hornblende, tirée de Kalinowski et al., 2000.....	21
Figure 7. Représentation a) de la structure générale des pyoverdines et b) du chromophore, tiré de (Cezard et al., 2014)	25
Figure 8. Structure a) du chromophore et b) de l'isopyoverdine de <i>Pseudomonas putida</i> BTP1.....	27
Figure 9. Etape intermédiaire de formation de ferrihydrite du premier protocole de production.	29
Figure 10. Formation de goethite lors du premier protocole de production.....	29
Figure 11. Dispositif sous atmosphère contrôlée utilisé lors du deuxième protocole de production	30
Figure 12. Poudre de goethite obtenue par le premier protocole de production	41
Figure 13. Poudre de goethite obtenue par la deuxième méthode de production	42
Figure 14. Courbe du point de charge nulle de la première goethite. La courbe représente la différence de pH entre le pH final après 48 h de contact avec la goethite et le pH initial (ΔpH) en fonction du pH initial (pH_i).....	42
Figure 15. Courbes du point de charge nulle de la deuxième goethite. Les courbes représentent la différence de pH entre le pH final après 48 h de contact avec la goethite et le pH initial (ΔpH) en fonction du pH initial (pH_i) pour les trois répétitions.	43
Figure 16. Images MEBE de la deuxième goethite à 10 et 2 μm	44
Figure 17. Images MEBE de la deuxième goethite à 1 μm et 600 nm.....	44
Figure 18. Images MEBE de la deuxième goethite à 600 et 300 nm	44
Figure 19. Image MEBE de la première goethite à 1 μm	45
Figure 20. Phosphore adsorbé à la surface de la première goethite en fonction du temps de contact avec des solutions de concentrations en phosphore initial de 50 et 10 mg.l ⁻¹ ainsi qu'à pH 6 et 8.	46
Figure 21. Chromatogramme de l'élution du surnageant de BTP1 dans le milieu CA par l'UPLC-MS. Les pics d'élution correspondant à la pyoverdine sont fléchés. L'axe des ordonnées représente le courant ionique total relatif (%). L'axe des abscisses représente le temps en minutes. Le courant ionique total (TIC) est de $1,45 \times 10^8$	50
Figure 22. . Spectre de masse du pic n°1 du chromatogramme d'élution correspondant à la pyoverdine produite par BTP1. Les pics correspondant aux fragments les plus importants à l'identification de la pyoverdine sont fléchés. L'axe des abscisses représente le rapport m/z et l'axe des ordonnées représente le courant ionique total relatif (%). Le TIC est de $4,18 \times 10^5$.	50

Figure 23. Spectre de masse du pic n°2 du chromatogramme d'élution correspondant à la pyoverdine produite par BTP1. Les pics correspondant aux fragments les plus importants à l'identification de la pyoverdine sont fléchés. L'axe des abscisses représente le rapport m/z et l'axe des ordonnées représente le courant ionique total relatif (%). Le TIC est de $4,18 \times 10^5$.	51
Figure 24. Culture de la souche sauvage BTP1 ainsi que de ses mutants M1, M3, M6 et M17 dans du milieu Casamino Acid durant 48 h à 30°C.....	51
Figure 25. Chromatogrammes d'élutions obtenu par UPLC-MS des surnageants de culture de BTP1 et de ses mutants M1, M3, M6 et M17. L'abscisse représente le courant ionique total relatif (%). L'ordonnée représente le temps en minutes. Le TIC est de $1,7 \times 10^8$	52
Figure 26. Cultures de BTP1 dans du milieu Casamino Acid possédant des concentrations en fer de 0, 2, 3 et 4 mg.l ⁻¹ de fer durant 24 h à 30°C.....	53
Figure 27. Concentration massique cellulaire en fonction de la DO à 600 nm pour les 7 cultures de BTP1 réalisées et courbe de tendance linéaire avec son équation et son facteur de détermination.....	54
Figure 28. Concentration cellulaire des cultures de BTP1 réalisée en fioles dans les milieux de culture King B (KB) et Casamino Acid (CA) ajoutés ou non d'une concentration en fer de 10,5 mg.l ⁻¹ (avec et sans fer).	55
Figure 29. Concentration cellulaire des cultures de BTP1 réalisée en bioréacteur dans le milieu de culture CA ajouté ou non d'une concentration en fer de 10,5 mg.l ⁻¹ (avec et sans fer) et soumises à une agitation de 600 ou de 700 rpm.....	56
Figure 30. Concentration en pyoverdine des cultures de BTP1 réalisée en bioréacteur dans le milieu de culture CA ajouté ou non d'une concentration en fer de 10,5 mg.l ⁻¹ (avec et sans fer) et soumises à une agitation de 600 ou de 700 rpm.....	57
Figure 31. Concentration en fer disponible dans les solutions de pyoverdine, surnageant et eau ultra pure à pH 6 et 8 en fonction du temps.....	59
Figure 32. Fer soluble cumulé relargué par unité de goethite pure à pH 6 en fonction de la durée de contact entre les solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	62
Figure 33. Fer soluble cumulé relargué par unité de goethite pure à pH 8 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	62
Figure 34. Fer soluble cumulé relargué par unité de goethite sorbée à pH 6 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	64
Figure 35. Fer soluble cumulé relargué par unité de goethite sorbée à pH 8 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	65
Figure 36. Phosphore soluble cumulé relargué par unité de goethite sorbée à pH 6 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	66
Figure 37. Phosphore soluble relargué par unité de goethite sorbée à pH 8 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est	

représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	66
Figure 38. Ratio de la quantité de phosphore soluble relargué sur la quantité de fer soluble relargué de la goethite sorbée à pH 6 après 24 h. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	68
Figure 39. Ratio de la quantité de phosphore soluble relargué sur la quantité de fer soluble relargué de la goethite sorbée à pH 8 après 24 h. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.....	70

Table des tableaux

Tableau 1. Longueurs d'ondes utilisées pour le dosage des éléments à l'ICP-OES.....	33
Tableau 2. Protocole d'élution de la méthode d'analyse des pyoverdines à l'UPLC-MS.....	35
Tableau 3. Composition élémentaire en sodium, potassium, magnésium et calcium des trois types de deuxième goethite (pure et sorbée à pH 6 et pH 8)	48
Tableau 4. Composition élémentaire en fer, aluminium, silicium et phosphore des trois types de deuxième goethite (pure et sorbée à pH 6 et pH 8)	49
Tableau 5. Moyennes et écarts-types des concentrations massiques en pyoverdine [mg.l ⁻¹] mesurées dans les surnageants de culture de la souche BTP1. Les milieux Casamino Acid utilisés possèdent une concentration en fer de 0, 2, 3 et 4 g.l ⁻¹	53
Tableau 6. DO à 600 nm et concentration massique cellulaire de BTP1 (moyenne ± écart type) pour les 7 cultures réalisées avec leurs durées respectives.....	54
Tableau 7. DO à 400 nm mesurée et concentration massique en pyoverdine calculée pour les quatre cultures en fioles de deux litres réalisées.....	58
Tableau 8. Concentration en fer dissous à partir de la goethite mise dans des solutions ayant des forces ioniques de 0, 0,17, 0,21 et 0,25 g.l ⁻¹	59
Tableau 9. Concentration en fer et en phosphore maximale présente sur la goethite pure ainsi que sur les goethites sorbées à pH 6 et à pH 8.....	61
Tableau 10. Concentrations en fer et en phosphore retrouvées initialement dans les solutions de pyoverdine, de surnageant, d'oxalate, d'ascorbate et d'eau à pH 6 et 8	61
Tableau 11. Résultats de Clémence B. représentant les teneurs en phosphore biodisponible, en phosphates de fer ainsi qu'en fer total [mg.100 g ⁻¹] dans l'horizon 0-25 cm de parcelles sous fertilisation azote, phosphore, potassium (NPK) ou sous aucune fertilisation (0)	71

Liste des abréviations

0	Sans fertilisation
Al	Aluminium
Anova	Analysis of variance
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Méthode de Brunauer-Emmett-Teller
CA	Casamino Acid
Ca	Calcium
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Fe	Fer
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
FEG	Field emission gun
K	Potassium
KB	King B
MEBE	Microscope électronique à balayage environnemental
Mg	Magnésium
Na	Sodium
NPK	Fertilisation classique azote, phosphore, potassium
P	Phosphore
rpm	Round per minute
Si	Silicium
Succ	Succinate
TIC	Total ion current
UPLC-MS	Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry
VVM	Volume d'air par volume de bioréacteur par minute

I. Introduction

La population mondiale augmente rapidement avec 2,6 milliards d'habitants en 1950, 6 milliards en 1999, 7,6 milliards en 2019 et une prédiction de 9,8 milliards pour 2050 (Nations Unies, 2019). La sous-alimentation croît également à travers le monde, touchant 821 millions d'individus en 2017, c'est-à-dire 11% de la population mondiale (FAO, 2018). Dans ce contexte de croissance démographique et de précarité alimentaire, les agriculteurs ont dû augmenter les productions alimentaires. Néanmoins, au niveau belge et de manière plus générale au niveau européen, le nombre d'hectares consacrés à l'agriculture ne cesse de diminuer. Entre 1985 et 2015, 59.000 ha de terres agricoles ont disparu en Région wallonne (SPF-Finances, 2016). La nécessité de nourrir les populations associée à une diminution des surfaces agricoles a requis l'utilisation accrue d'intrant afin d'augmenter les rendements par hectare. En Europe septentrionale, l'apport d'engrais depuis 1950 est passé de 45 kg.ha⁻¹ à 250 kg.ha⁻¹ (Fresco, 2003).

La fertilité d'un sol résulte naturellement de l'altération du matériau parental, des conditions climatiques ou encore des organismes vivants dans le sol. Cependant, cette fertilité est également grandement impactée par l'homme et ses pratiques culturales. Un des défis majeurs de l'agriculture actuelle est d'assurer une bonne fertilité des sols ainsi qu'un rendement élevé des productions tout en favorisant des pratiques agricoles durables et respectueuses de l'environnement.

Le phosphore (P) est un élément essentiel à la croissance et au développement des végétaux. Il fait partie des nutriments utilisés dans les fertilisations classiques NPK (azote, phosphore, potassium). En effet, 5,7 billions d'hectares à travers le monde contiennent une quantité trop faible de phosphore biodisponible afin d'assurer une production végétale durable (Batjes, 1997; Hinsinger, 2001). Les déficiences en phosphore sont une limitation majeure aux productions agricoles. Afin de maintenir une concentration en phosphore optimale pour les plantes, les sols ont été saturés en phosphore par l'apport de fertilisant (Menezes-Blackburn et al., 2018). Cependant, les fertilisants phosphatés sont généralement appliqués en excès et sont responsables des dégâts environnementaux comme une diminution de la fertilité des sols, une érosion des sols ou encore une diminution de la biodiversité (Krumina et al., 2016). Une concentration trop élevée en phosphore, dépassant la capacité de rétention des sols, peut également entraîner des pertes vers les milieux aquatiques, en plus du phosphore provenant des rejets domestiques et industriels. Une élévation de la concentration en ions phosphates peut causer une eutrophisation des milieux aquatiques, une diminution de la qualité des eaux ainsi qu'une prolifération d'algues et la dégradation en écosystèmes aquatiques (Diaz et al., 2008; Krumina et al., 2016). De plus, l'efficacité des engrais phosphatés est de 10%, ce qui signifie que seulement 10% du phosphore amené au sol est prélevé par les cultures. En effet, 75% du phosphore est fixé par d'autres éléments du sol comme les oxydes/hydroxydes ou les cations calcium. Une partie du phosphore est également perdue par ruissèlement ou lixiviation au sein du profil de sol. Les complexes formés entre les ions phosphates et les oxydes de fer et d'aluminium peuvent représenter jusqu'à 25% du phosphore total des sols (Tiessen et al., 1984; Cross et al., 1995; Tiessen, 2008). La majorité des sols contiennent donc une grande réserve en phosphore indisponible provenant de

l'altération du matériau parental, mais également de l'apport des fertilisants durant de nombreuses années.

Le phosphore, ressource non renouvelable, présente un risque de pénurie en raison d'une grande production de fertilisants phosphatés et d'une demande croissante. La raréfaction des ressources en roches phosphatées pourrait à l'avenir entraîner des tensions géopolitiques, une montée des prix et la diminution des rendements des cultures (Morel et al., 2018). En effet, aucune alternative renouvelable n'a encore émergé afin de produire des engrais phosphatés (Menezes-Blackburn et al., 2018). Afin d'assurer une production végétale plus durable et respectueuse de l'environnement, les alternatives aux fertilisants doivent se concentrer sur la mobilisation des fractions de phosphore indisponible déjà présentes dans les sols (Menezes-Blackburn et al., 2018).

Les sols regorgent d'une grande diversité de micro-organismes parmi lesquels des bactéries capables de solubiliser le phosphate indisponible par divers mécanismes. Ces bactéries pourraient apporter une solution biotechnologique au déficit de phosphore et permettre une agriculture durable. De nombreuses recherches sont actuellement réalisées sur ces dernières afin de mieux comprendre leurs modes d'action, leurs capacités à solubiliser le phosphore, leurs impacts sur le phosphore biodisponible et leurs diversités fonctionnelles.

Un des mécanismes d'action d'acquisition de nutriments est la production de sidérophores. Les sidérophores sont des ligands présentant une grande affinité avec les ions ferriques. Ils sont produits par certaines bactéries notamment du genre *Pseudomonas sp.* Les sidérophores sont relargués dans des conditions de déficit en fer (Fe) afin d'induire la solubilisation des minéraux ferreux dans les sols comme les oxydes de fer (Hersman et al., 1996; Fardeau et al., 2011). Ces molécules forment des complexes solubles avec des ions ferriques, les rendant ainsi disponibles pour les organismes vivants. En effet, le fer est un élément essentiel aux bactéries, mais également aux plantes notamment pour la photosynthèse ou la constitution d'enzymes. Cependant, les concentrations en fer biodisponible sont très limitées dans les sols en raison d'une faible solubilité des oxydes/hydroxydes de fer comme l'hématite ou la goethite (Saha et al., 2016).

Les sidérophores présentent un réel engouement de la part de la communauté scientifique en raison de leur efficacité, déjà démontrée, à solubiliser les oxydes/hydroxydes de fer présents dans les sols dont le principal est la goethite (Reichard et al., 2007). De plus, les oxydes/hydroxydes de fer ont une grande surface spécifique et contrôlent la mobilité et la disponibilité de nombreux ions comme les phosphates dans les sols. Les sidérophores pourraient dès lors, libérer du fer par dissolution des oxydes de fer, mais également co-solubiliser les ions phosphates initialement adsorbés à sa surface.

Les sidérophores ont donc un grand potentiel en tant qu'alternative aux fertilisants phosphatés, car ils pourraient induire la solubilisation des ions phosphates présents au niveau des oxydes de fer lors de la dissolution de ces derniers.

II. État de l'art

1. Phosphore dans les sols

1.1. Cycle biogéochimique du phosphore

Le cycle biogéochimique du phosphore influence la dynamique à long terme des différentes fractions de phosphore dissous, inorganique, organique et microbien présentes au sein des sols (Morel et al., 2018). La répartition du phosphore au sein de ces différentes fractions dépend des processus physico-chimiques et biologiques qui se déroulent dans les sols comme les variations de pH, la production d'anions organiques, la production de phosphatases ainsi que par l'immobilisation de phosphore dans la fraction microbienne du sol.

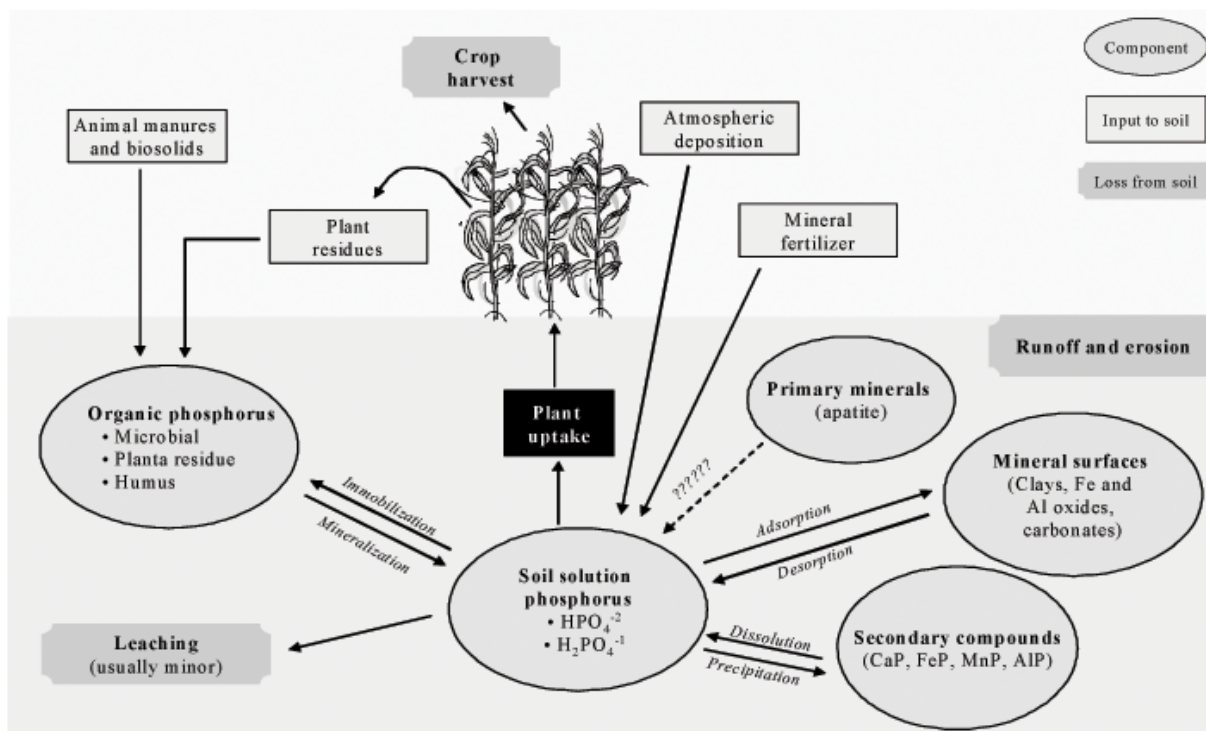


Figure 1. Cycle biogéochimique du phosphore des écosystèmes terrestres, tirée de (Vendramini et al., 2007)

Le cycle biogéochimique du phosphore dans un agrosystème est repris à la figure 1. Il reprend la circulation du phosphore au sein des plantes, des organismes vivants dans les sols et du sol en lui-même. Les principales sources de phosphore inorganiques proviennent de l'altération des minéraux primaires comme l'apatite et des roches phosphatées ainsi que de l'apport de fertilisants chimiques (Halder et al., 1990). Les principales sources de phosphore organiques sont les apports de ferme, les boues d'épuration ainsi que les résidus d'animaux et de végétaux. Les flux sortants sont les exportations de phosphore accumulé dans les cultures, les pertes par migration en profondeur, par ruissèlement vers les eaux de surface ou par érosion. Le principal flux de phosphore sortant dans les agroécosystèmes est l'exportation par les cultures avec deux tiers du phosphore prélevé par les végétaux présents au niveau des grains (Vendramini et al., 2007; Morel et al., 2018).

Les végétaux ainsi que les organismes du sol ne peuvent prélever que le phosphore biodisponible dans les sols. Le phosphore biodisponible se retrouve sous forme d'orthophosphates H_2PO_4^- ou de HPO_4^{2-} libre dans la solution du sol (Beever et al., 1981; Havlin et al., 2013).

Le phosphore organique peut être adsorbé à la surface de particules du sol, incorporé au sein de la biomasse ou associé à la matière organique du sol (Richardson et al., 2011). La fraction de phosphore microbien est importante dans les sols et est équivalente ou parfois excède la fraction du phosphore contenue dans les végétaux (Achat et al., 2010). Le phosphore organique est principalement retrouvé sous forme de phytate, forme la plus stable de phosphore organique, synthétisé par les micro-organismes et les plantes (Dalal, 1977). D'autres composés organiques comme les phosphomonoesters, les phosphodiesters ou encore les acides nucléiques sont également retrouvés dans les sols (Goldstein, 1994). La fraction de phosphore organique peut être minéralisée par certains micro-organismes des sols.

Les orthophosphates libres réagissent fortement avec d'autres éléments présents dans les sols comme les ions ferriques (Fe^{3+}), aluminium (Al^{3+}) et calcium (Ca^{2+}). Ces orthophosphates peuvent dès lors précipiter en minéraux secondaires avec d'autres ions et former des phosphates de fer, d'aluminium ou de calcium. Ils peuvent également être adsorbés à la surface de minéraux comme les oxydes/hydroxydes ou encore les argiles comme la kaolinite. Les phénomènes de précipitation et d'adsorption sont hautement dépendants du pH et du type de sol. De ce fait, dans les sols acides, les ions phosphates sont principalement fixés par les oxydes/hydroxydes de fer et d'aluminium alors que dans les sols alcalins, le phosphore est fixé par le calcium (Goldstein, 1986).

La désorption du phosphore de la surface des minéraux et la dissolution des minéraux contenant du phosphore minéral permettent d'alimenter le pool de phosphore libre et disponible pour les organismes vivants (Havlin et al., 2013).

Les micro-organismes du sol jouent un rôle clé dans le cycle biogéochimique du phosphore, car ils sont capables d'altérer la surface des minéraux, de décomposer les apports organiques et de minéraliser le phosphore organique afin de le rendre disponible pour eux-mêmes et pour les plantes.

1.2. Importance du phosphore chez les organismes vivants

Le phosphore est un élément essentiel pour la croissance et le développement des plantes ainsi que des micro-organismes (Rodríguez et al., 1999). Le phosphore joue un rôle important au niveau du stockage et du transfert de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) et d'ADP (adénosine diphosphate) permettant la formation de nombreux composés. De plus, le phosphore est présent au niveau des phospholipides qui forment les membranes des cellules. Le phosphore agit au niveau de la croissance et du développement des plantes, surtout au niveau des jeunes pousses. Il permet une meilleure rigidité des tissus et une plus grande résistance de la plante au froid et à certains pathogènes. Enfin, il a un rôle crucial au niveau génétique et reproduction puisque c'est un composant de l'ADN (acide désoxyribonucléique) (Tiessen, 2008; Morel et al., 2018).

1.3. Stock de phosphore biodisponible

La concentration en phosphore biodisponible dans les sols varie entre 0,1 et 10 μM . Cependant, afin d'assurer une croissance optimale, les cultures de graminées nécessitent 1 à 5 μM tandis que les cultures fort demandeuses, comme les tomates, en demandent de 5 à 60 μM (Raghothama et al., 2005). De plus, une perte de rendement allant jusqu'à 15% des cultures peut être engendrée par une concentration plus faible en phosphore que l'optimale (Hinsinger, 2001).

En Belgique, les sols agricoles présentent des concentrations en phosphore biodisponible très contrastées (figure 2). Au Sud, une carence est majoritairement observée dans les horizons de surface avec une quantité insuffisante pour répondre aux besoins des plantes à savoir en dessous de 4,6 mg P.100 g⁻¹ de terre sèche. Au nord de la Belgique au contraire, les concentrations de phosphore explosent avec des teneurs allant jusqu'à 17,6 mg P.100 g⁻¹ de terre sèche, pouvant causer une pollution des milieux aquatiques (Genot et al., 2009).

Une teneur en phosphore de 4,6 à 7,5 mg P.100 g⁻¹ de terre sèche est optimale pour les cultures. Cependant, en Wallonie, une grande partie du territoire présente des teneurs trop faibles pour assurer la bonne croissance et le bon développement des cultures (Genot et al., 2009, 2012).

Dans l'ensemble des grands types de sols dans le monde, le phosphore biodisponible représente entre 1,5 et 11% du phosphore total (Cross et al., 1995; Menezes-Blackburn et al., 2018).

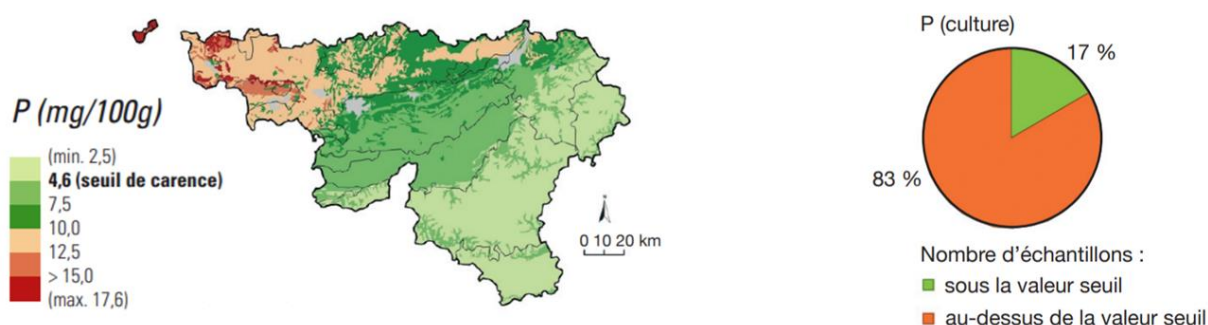


Figure 2. Teneur moyenne en phosphore biodisponible (mg P.100 g⁻¹ de terre sèche) au niveau de l'horizon 0-25 cm des terres de cultures en Région wallonne de 1998 à 2002. ASBL REQUASUD, tirée de (Genot et al., 2009).

1.4. Stock de phosphore indisponible

La plupart des sols agronomiques présentent une grande réserve de phosphore dû à l'apport constant de fertilisants phosphatés. Cependant, la majorité du phosphore dans les sols est indisponible pour les organismes vivants en raison d'une immobilisation du phosphore très rapide après son application par précipitation, adsorption ou encore complexation (Nisha et al., 2014). En effet, 75% des apports subissent des phénomènes de précipitation et d'adsorption, notamment avec les ions calcium ou à la surface des oxydes de fer (Tiessen, 2008). En Europe de l'Ouest, plus de 1,1 tonnes de phosphore par hectares ont été appliquées sur les sols agricoles entre 1965 et 2007 et seulement 0,3 tonne de phosphore par hectares est estimée avoir été enlevé du système sol (Sattari et al., 2012).

La disponibilité du phosphore inorganique est fortement contrôlée par le pH et le type de sol et trouve son maximum entre un pH 5,5 et 7 (Devau et al., 2009).

Le phosphore inorganique biodisponible représente en général moins de 10% du phosphore total. Le phosphore présent à la surface ou au sein des oxydes de fer et d'aluminium compte pour maximum 25% du phosphore total. Cette fraction est plus représentée au niveau des sols acides, plus fortement altérés comme l'Ultisols (sols acides des régions humides, enrichis en argiles et dominés par des minéraux comme le quartz, la kaolinite et les oxydes de fer) ou l'Oxisols (sols des régions tropicales et subtropicales dominés par des minéraux à faible activité comme le quartz, la kaolinite ou les oxydes de fer). Le phosphore lié aux ions calcium ou à la surface de minéraux primaires calcique peut atteindre 66% dans les sols jeunes peu altérés comme les Entisols (sols jeunes sans développement d'horizons) et est inférieur à 1% dans les sols fortement altérés comme les Oxisols. Dans les sols moins altérés et présentant un pH plus élevé, les interactions du phosphore avec les minéraux calciques sont dominantes. La dernière fraction correspond au phosphore résiduel, physiquement encapsulé dans les minéraux. Cette fraction représente environ 40% dans l'ensemble des sols (Tiessen et al., 1984; Cross et al., 1995).

Les formes organiques de phosphore peuvent s'élever jusqu'à 30% du phosphore total (Cross et al., 1995). Le phosphore contenu dans la fraction microbienne représente 2 à 10% du phosphore total. De plus, dans les horizons de surface, cette fraction peut s'élever jusqu'à 50% du phosphore total (Achat et al., 2010).

Le phosphore indisponible total représente donc environ 86% du phosphore des sols. La distribution de ce phosphore inorganique dans les différentes fractions est fonction du degré d'altération, du pH, des cations présents et des pratiques agricoles en termes de fertilisations (Cross et al., 1995).

Dans de nombreux sols agricoles à travers le monde, le phosphate lié au fer représente la plus grande fraction de phosphore inorganique (Chang et al., 1958).

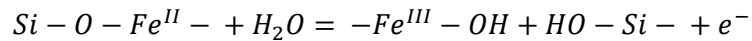
En théorie, les stocks de phosphore indisponible accumulés dans les sols agricoles permettraient de subvenir aux besoins des cultures avec un rendement maximal pendant 100 ans (Goldstein et al., 1999). Ainsi, des scientifiques du monde entier se sont récemment concentrés sur des moyens de rendre biodisponible les réserves en phosphore indisponible contenues dans les sols (Menezes-Blackburn et al., 2018).

2. Fer dans les sols

2.1. Cycle biogéochimique du fer

Au sein des sols, trois grandes fractions de fer sont retrouvées à savoir le fer inclus dans les minéraux primaires et secondaires, le fer soluble ainsi que le fer lié à la matière organique (Robin et al., 2008). Le fer est présent dans les sols principalement sous forme de silicates primaires et secondaires comme la pyroxène, l'amphibole, la biotite ou encore l'olivine et la hornblende ainsi que dans les sulfites (Schwertmann, 1988). Les minéraux primaires instables dans les sols sont altérés en présence d'eau et d'oxygène. Cette altération est fortement accélérée par l'activité des micro-organismes et par les plantes (Hinsinger, 2001). Au cours de l'altération, des ions ferreux (Fe^{2+}) et ferriques (Fe^{3+}) sont relargués dans la solution du sol. De plus, les ions ferreux, en

conditions d'altération aérobies, peuvent s'oxyder en ions ferriques insolubles. En effet, à pH neutre de 7,4, la solubilité de l'ion ferreux et ferrique sont respectivement de 10^{-1} et de 10^{-18} M. Les ions ferriques sont directement hydrolysés par des ions hydroxydes et précipitent sous forme de minéraux secondaires faiblement soluble. Ces minéraux peuvent être des oxydes de fer comme l'hématite, des oxyhydroxydes comme la goethite ou encore des hydroxydes et d'autres minéraux moins organisés comme la ferrihydrite (Bou-Abdallah, 2010; Saha et al., 2016). La réaction d'altération des ions ferreux des minéraux silicatés en ions ferriques au sein d'oxydes de fer est la suivante (Schwertmann, 1996):



La proportion du fer provenant des minéraux primaires, solubilisée et précipitée en oxydes de fer, dépend du niveau d'altération des sols et peut aller jusqu'à 100% dans les sols les plus altérés. Les oxydes de fer ne peuvent être dissous par la réaction inverse de l'hydrolyse à savoir la protonation. Cependant, la complexation, notamment avec des ligands organiques, ou des réactions de réduction par les micro-organismes lors d'un déficit en oxygène peuvent entraîner une dissolution des oxydes (Schwertmann, 1996). Les ions ferriques immobiles sont alors réduits ions ferreux mobile et migrent au sein du profil du sol pour être oxydés à une plus grande profondeur. Ce processus s'effectue durant l'ensemble de la pédogenèse et mène à une distribution très hétérogène du fer dans les sols (Schwertmann, 1996).

Le fer peut également être présent sous la forme d'autres minéraux secondaires comme les phyllosilicates ou les minéraux argileux. Dans des conditions très réductrices, des sulfures ferreux comme la pyrite sont formés. De plus, le fer peut également être adsorbé à la surface de minéraux, en particulier les minéraux argileux, grâce à la grande capacité d'échange cationique (Robin et al., 2008).

La concentration en fer disponible dans les sols dépend de sa répartition au sein des phases solides, mais également des réactions de dissolution et de précipitation des minéraux, mais également des réactions associations et dissociations avec des complexes du sol (Robin et al., 2008).

2.2. Importance du fer chez les organismes vivants

Le fer est un élément essentiel chez les organismes vivants. En raison de ses deux états d'oxydation et donc de son potentiel redox, le fer joue un rôle important dans de nombreux processus métaboliques comme la photosynthèse, la respiration, le cycle de Krebs ou encore le transport d'électrons (Guerinot et al., 1994; Briat, 2009). Il intervient également dans le métabolisme énergétique, la synthèse de l'ADN ou encore la régulation des gènes (Bou-Abdallah, 2010). Pour finir, le fer prend part à de nombreux processus enzymatiques comme la régulation de la biosynthèse des sidérophores, des vitamines, des toxines ou des antibiotiques (Saha et al., 2016). Un déficit en fer se marque généralement par des pertes au niveau du rendement des cultures en raison d'une chlorose puis d'un dépérissement des feuilles et une mortalité chez les micro-organismes du sol.

2.3. Quantité de fer présent dans les sols

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre (Huber, 2005). Cependant, le déficit en fer chez les plantes est bien connu des agriculteurs alors que les minéraux ferreux sont omniprésents dans les sols. La faible quantité de fer biodisponible est due à une faible solubilité et une faible cinétique de dissolution des oxydes de fer à pH se rapprochant de la neutralité comme dans les sols (Liermann et al., 1999; Kraemer, 2004). La concentration en fer biodisponible est donc trop faible dans les sols pour subvenir aux besoins des organismes vivants, notamment pour les bactéries aérobies (Bou-Abdallah, 2010). Les concentrations optimales en fer pour les micro-organismes et les plantes sont de respectivement 10^{-5} à 10^{-7} M et de 10^{-4} à 10^{-9} M (Guerinot et al., 1994). La solubilité des oxydes de fer augmente avec la diminution du pH. Les concentrations nécessaires en ions ferriques solubles pour les plantes ne sont retrouvées que dans les sols très acides ayant un pH compris entre 3,5 et 3,9 (Robin et al., 2008)

Les concentrations en fer biodisponible dans les sols en Belgique entre 2003 et 2008 se situaient entre 25 et 32 mg Fe.100 g⁻¹ de terre sèche (Genot et al., 2012).

Pour des sols aérés et ayant un pH de 7, la concentration en ion ferrique disponible est estimée à 10^{-17} M dans la solution du sol ce qui équivaut à 10^8 fois moins à la concentration nécessaire par la croissance optimale des plantes (Boukhalfa et al., 2002).

Les oxydes de fer sont donc omniprésents au sein des sols et peuvent contenir jusqu'à 25% du phosphate des sols, le rendant ainsi indisponible. L'étude de ces derniers fera donc l'objet d'une attention particulière dans ce travail.

3. Oxydes de fer

3.1. Différents oxydes de fer au sein des sols

Le terme oxydes de fer est utilisé comme générique et regroupe les hydroxydes, les oxyhydroxydes comme la goethite (α -FeOOH) ou la lépidocrite (γ -FeOOH) ainsi que les oxydes de fer comme la magnétite (Fe_3O_4) ou l'hématite (α - Fe_2O_3). La goethite est un produit majeur de l'altération et prédomine dans les sédiments jeunes. Elle donne une couleur jaune-orange aux roches. La goethite peut se former encore par l'oxydation d'ions ferreux ou de composés ferreux solides comme la pyrite. Elle peut également être formée par l'intermédiaire de la dissolution de ferrihydrite. Dans le deuxième cas, la formation de la goethite entre alors en compétition avec la formation de l'hématite qui ne peut se former qu'à partir de la déshydratation de la ferrihydrite ($\text{Fe}_5\text{HO}_8.4\text{H}_2\text{O}$). La goethite peut également se transformer en hématite par une réaction de déhydroxylation à haute température (Schwertmann, 1996).

3.2. Proportion des oxydes de fer dans les sols

Les deux sortes d'oxydes de fer les plus abondants dans les sols sont de loin la goethite puis l'hématite (Torrent et al., 1990; Schwertmann, 1996; Kraemer, 2004). Ensuite, en moindre quantité, la magnétite et le ferrihydrite ($\text{Fe}_5\text{HO}_8.4\text{H}_2\text{O}$) sont également présents dans les sols

(Antelo et al., 2005). La goethite est l'oxyde de fer le plus stable retrouvé dans la nature (Liu et al., 2014).

Les sols présents dans les régions tropicales ou subtropicales possèdent généralement plus d'hématite, rendant les sols rouges. Les sols tempérés, au contraire, n'en possèdent que très peu ou pas du tout. La goethite est l'oxyde dominant dans les sols des régions tempérées avec une couleur de sol jaune-brun. En effet, l'hématite est favorisée dans les pédoclimats chauds et secs où la déshydratation de la ferrihydrite est privilégiée sur la dissolution de cette dernière. La ferrihydrite est donc présente avec la goethite dans les sols des climats tempérés et froids surtout dans les concrétions, les horizons d'oxydation des sols gleyfiés et les horizons B sodiques des podzols.

3.3. Propriétés des oxydes de fer

Les oxydes de fer sont formés de couches d'ions oxygène et de groupements hydroxydes qui sont rapprochés de façon hexagonale dans le cas de la goethite et l'hématite. Les cations ferriques occupent les interstices avec les anions oxygène afin de former un octaèdre avec deux ions ferriques ayant comme voisin direct trois oxygènes et trois groupements hydroxydes dans le cas de la goethite. D'autres cations métalliques trivalents de taille similaire comme Al^{3+} , Mn^{3+} ou Cr^{3+} ainsi que des cations divalents comme Ni^{2+} , Co^{2+} ou Cu^{2+} peuvent s'incorporer dans la structure par une substitution isomorphique. Cependant, cette substitution modifie la solubilité et la cinétique de dissolution des oxydes de fer. Au sein d'un sol, environ un tiers des ions ferriques sont substitués par des ions aluminium dans la goethite entraînant une baisse de son taux de dissolution (Schwertmann, 1996; Kraemer, 2004).

Les oxydes de fer sont caractérisés par une grande réactivité de surface étant donné la faible taille des particules allant de 5 à 100 nm. En effet, les oxydes de fer sont parmi les plus petites particules du sol. La surface spécifique est généralement située entre 50 et 300 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ (Schwertmann, 1996). Cette grande réactivité leur permet d'adsorber de nombreux ions présents dans les sols comme les ions phosphates. Les oxydes de fer contribuent fortement à la capacité d'adsorption des sols malgré qu'ils ne représentent que quelques pourcents de l'ensemble des particules du sol et contrôlent donc le devenir ainsi que la mobilité de nombreuses espèces chimiques des sols. L'adsorption se réalise principalement sur la goethite et la ferrihydrite (Villalobos et al., 2008, Schwertmann, 1988).

La surface des oxydes de fer est couverte de groupements fonctionnels hydroxydes. Ces groupements chargés négativement (FeO^-) par perte d'un proton ou chargés positivement (FeOH_2^+) par gain d'un proton en fonction du pH de la solution du sol. Les charges de surface de ces groupements contribuent grandement à la capacité d'adsorption d'ions. Le point de charge nulle des oxydes de fer est défini par le pH auquel les concentrations de surface en FeO^- et FeOH_2^+ sont égales. La charge de surface de l'oxyde est alors nulle. En dessous du point de charge nulle, la charge nette des oxydes sera positive et des anions seront majoritairement adsorbés à la surface comme les phosphates, les silicates ou des substances humiques. Au contraire, au-dessus du point de charge nulle, la charge nette de surface sera négative et permettra une adsorption majoritaire de cations. Ces oxydes peuvent donc agir comme un puits d'ions présents dans les sols et ainsi

restreindre leur mobilité et leur disponibilité pour les organismes vivants (Schwertmann, 1988, 1996).

Le point de charge nulle de la goethite est généralement aux alentours de 8,1 mais peut-être grandement modifié lors de l'adsorption d'ions phosphates et descendre jusque 5,1 (Parfitt et al., 1976).

3.4. Solubilité des oxydes de fer

Le déficit en fer de nombreux environnements ne provient pas d'une faible teneur en fer total, mais en fer disponible due à une très faible solubilité et d'une lente cinétique de dissolution des minéraux ferreux dans les sols agricoles (Kraemer, 2004).

La solubilité des oxydes de fer dans les sols dépend des propriétés des oxydes de fer. Premièrement, la ferrihydrite présente une plus grande solubilité et cinétique labile en raison d'une plus grande surface spécifique et d'une plus faible stabilité que la goethite ou l'hématite. Elle peut dès lors contrôler la concentration en fer dans la solution malgré sa faible quantité présente dans les sols (Trolard et al., 1987). En effet, la constante de solubilité de la goethite est de 0,36 (Parker et al., 1995) alors qu'elle est de 3,55 pour la ferrihydrite (Schindler et al, 1963 cité par (Kraemer, 2004)). La goethite est l'oxyde le plus retrouvé dans les sols agricoles, mais également celui présentant la plus faible solubilité. Deuxièmement, plus la taille des particules d'oxydes diminue, plus leur surface spécifique augmente. Lorsque la taille des cristaux de goethite et hématite diminue, leur solubilité augmente donc et tant vers celle de la ferrihydrite (Trolard et al., 1987). La diminution de la taille des particules permet également une plus grande cinétique de dissolution des oxydes (Kraemer, 2004). Troisièmement, la substitution isomorphique des oxydes a pour conséquence de diminuer l'énergie libre standard et donc de diminuer la solubilité des oxydes (Strauss et al., 1997).

La solubilité des oxydes dépend également des propriétés et de la composition de la solution du sol. Premièrement, la solubilité des oxydes diminue avec l'augmentation du pH (Yoshida et al., 2002; Robin et al., 2008). En effet, l'activité des ions ferriques est maximale à un pH de 3,5 avec 10^{-9} M et minimale à un pH de 8 avec 10^{-24} M (Lindsay et al., 1982). Dans les sols agricoles, le pH est généralement proche de la neutralité ou alcalin où les oxydes de fer ont une solubilité minimale. La solubilité des oxydes dépend également des conditions redox de la solution du sol. La dissolution réductive se produit dans des sols saturés et très faiblement aérés. Cependant, la majorité des sols présentent des conditions oxydatives, à savoir des sols bien aérés. La contribution des ions ferreux à la fraction du fer soluble dans la solution du sol est très faible avec une concentration négligeable de 10^{-20} M à pH 7 (Robin et al., 2008). La force ionique de la solution ou encore la présence de ligands influencent également la solubilité des oxydes.

3.5. Adsorption et désorption du phosphore

Les surfaces des oxydes de fer sont parmi les plus réactives au niveau de l'adsorption d'ions phosphates en raison d'une très grande surface spécifique ainsi que d'une charge de surface positive à des pH couramment retrouvés dans les sols tempérés (Schwertmann, 1988; Antelo et al., 2005). Dans de nombreux types de sols, la mobilité et donc la disponibilité des ions phosphates

sont fortement influencées par la présence d'oxydes de fer malgré une faible quantité (Ramulu et al., 1967). Les ions phosphates adsorbés sont indisponibles pour les organismes vivants et diminuent la solubilité des oxydes de fer (Borggaard, 1983; Gálvez et al., 1999). Dans certains sols, plus de 25% du phosphore total sont adsorbés au niveau de ces oxydes (Cross et al., 1995).

Les réactions d'adsorption et de désorption des ions phosphates sont très importantes au niveau de la dynamique du phosphore au sein des sols. Ces deux réactions ont un comportement bi-phasique. La première phase est caractérisée par une adsorption très rapide du phosphate tandis que la deuxième est plus lente (Torrent et al., 1992 ; Wang, et al., 2013). Différents modèles ont été créés afin d'expliquer ces deux réactions et le plus reconnu est celui de Barrow (Barrow, 2015). Dans ce modèle, la première phase se caractérise par une adsorption rapide des ions phosphates à la surface des oxydes. La deuxième phase se traduit par la création d'un gradient de diffusion des ions phosphates adsorbés à la surface aux ions phosphates incorporés au sein de la matrice du solide. Une lente diffusion des ions de la surface vers l'intérieur du solide aurait donc lieu lors de cette deuxième phase. Une deuxième théorie de ces réactions basiques serait l'adsorption des ions phosphates à des sites de liaisons fortes et faibles (Torrent et al., 1992 ; Wang, et al., 2013). Malgré ces deux hypothèses, peu de recherches du modèle à l'échelle moléculaire ont émergé sur une possible diffusion ou adsorption sur des sites de liaisons plus ou moins faibles (Krumina et al., 2016).

Différentes structures de liaisons entre les ions phosphates et la surface des oxydes de fer sont discutées. Une liaison bidentée pourrait avoir lieu où deux groupements de surface des oxydes réagissent avec un ion phosphate HPO_4^{2-} pour former des complexes bidentés (Schwertmann, 1996). Deux ions phosphates réagiraient donc avec un ion ferrique (Parfitt et al., 1976). Les liaisons dépendent évidemment de la protonation des ions adsorbés (Krumina et al., 2016).

Une forte capacité d'adsorption est favorisée avec des plus petites particules ou de fins feuilletts de goethite, montrant peu de substitution de fer avec de l'aluminium (Torrent et al., 1990).

Le taux de désorption du phosphate est influencé par le pH de la solution et découle de considérations électrostatiques. La désorption des ions phosphates augmente lorsque le pH de la solution augmente également. En effet, plus le pH augmente, plus les ions hydroxydes du milieu entrent en compétition avec les ions phosphates pour les sites de liaisons à la surface de la goethite. De plus, avec l'augmentation de pH et donc le rapprochement du point de charge nulle, la charge positive de la surface des oxydes diminue pour devenir nulle au point de charge nulle. Le point de charge nulle moyen est de 8,1 pour la goethite. En dessous de ce pH, la goethite aura donc des charges positives à sa surface et d'autant plus que le pH est acide. Les interactions électrostatiques entre la surface des oxydes et les ions phosphates seront dès lors plus importantes et la désorption sera plus lente (Fernández-baca, 2010; Krumina et al., 2016).

Une spéciation des espèces adsorbées à la surface des oxydes de fer est observée en fonction du pH, mais également au cours de la désorption. En effet, au cours de la désorption avec l'augmentation du pH, certaines espèces sont perdues de la surface alors que d'autres sont déprotonées ce qui contribue à un changement global de la spéciation de la surface de la goethite. À des pH acides en dessous de 4, les ions phosphates triplement ou doublement protonés sont

prédominants sur la goethite. À pH entre 6 et 8 couramment retrouvés dans les sols, des ions phosphates doublement à simplement protonés sont retrouvés sur les oxydes. Les ions les plus protonés se désorbent préférentiellement. À un pH donné, les ions doublement protonés se désorbent plus facilement de la surface de la goethite que les ions simplement protonés en raison d'une énergie d'activation pour surpasser la charge positive de l'oxyde de fer inférieur (Krumina et al., 2016).

Les ions phosphates peuvent également être adsorbés sur d'autres oxydes, les minéraux argileux, la matière organique ou encore les carbonates de calcium. Leurs concentrations dans les sols influenceront la quantité de phosphate adsorbé à la surface des oxydes (Borgaard, 1983).

De nombreux oxydes synthétiques ont montré des capacités d'adsorption des ions phosphates semblables à ceux retrouvés dans les sols (McLaughlin et al., 1981). Dans ce travail, la goethite est utilisée comme oxyde de fer modèle. En effet, la goethite est l'oxyde de fer le plus retrouvé dans les sols des régions tempérées. De plus, la goethite est l'oxyde privilégié comme adsorbant modèle de nombreuses expériences de sciences du sol ou environnementales (Reichard et al., 2007; Fernández-baca, 2010; Wang, et al., 2013).

4. Cortège microbien des sols

Le sol renferme une énorme diversité d'organismes vivants tels que les micro-organismes ayant des fonctions variées. Ce cortège de micro-organismes est principalement concentré au niveau de la rhizosphère en raison de l'exsudation de carbone des racines issu de la photosynthèse. La flore rhizosphérique est majoritairement constituée de bactéries qui ont un impact sur la croissance et le développement des plantes. Elles sont regroupées sous le terme de « bactéries promotrices de la croissance des plantes » et appartiennent à plusieurs genres comme *Pseudomonas sp.*, *Azospirillum sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.* ou encore *Rhizobium sp.* (Parani et al., 2012).

Les effets de ces bactéries sur la croissance des plantes peuvent être directs avec la production d'hormones promotrice de la croissance, la fixation de l'azote ou la solubilisation de nutriments par altération des minéraux (Krasilinov, 1961). Des effets indirects sont également reportés comme la production d'antibiotiques ou de sidérophores visant à réduire ou à prévenir l'effet néfaste des pathogènes sur la croissance et le développement des plantes (Leong, 1986).

4.1. Acclimatation des micro-organismes aux carences minérale

Différentes espèces de bactéries, seules ou en communauté complexe, ont une capacité à altérer les minéraux présents dans les sols et diminuer leur stabilité. Ces bactéries peuvent appartenir au genre *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Acromobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* ou encore *Bacillus* (Robert et al., 1986; Uroz et al., 2009). Ces bactéries sont capables d'altérer des minéraux divers comme la biotite, le granite, la goethite, l'hématite, la calcite, la dolomite ou encore la hornblende afin de relarguer des nutriments pour les plantes (Douglas et al., 1998; Goldstein et al., 1999). Ces bactéries jouent un rôle clé dans la fertilité des sols à travers les cycles biogéochimiques des éléments (Liermann et al., 1999). La population de

bactéries épilithiques, vivants à la surface des roches et minéraux, sont composés à 50% des Gram négatifs comme les *Pseudomonas sp.* (Certini et al., 2004, McNamara et al., 2006).

Ces bactéries suscitent un grand intérêt scientifique en raison de leur potentiel en tant que biofertilisant naturel, alternative biotechnologique aux fertilisants chimiques actuellement utilisés en agriculture (Rodríguez et al., 2006). La biofertilisation permettrait de réduire les frais liés à l'achat de fertilisants chimiques, de diminuer l'impact environnemental et de rendre l'agriculture plus durable en utilisant les éléments présents dans les sols. L'inoculation de telles bactéries a déjà permis une hausse significative du rendement et des prélèvements de nutriments par les plantes (Zaidi et al., 2007).

4.2. Mobilisation du phosphore

Les micro-organismes du sol jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique du phosphore et dans sa biodisponibilité pour les plantes. En raison de la déficience en phosphore retrouvé dans de nombreux sols, l'intérêt porté à ces micro-organismes a fortement augmenté durant les dernières décennies (Richardson et al., 2011). Les bactéries du genre *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* sont les plus puissantes dans la solubilisation du phosphore (Hayat et al., 2010).

Différents mécanismes sont mis en œuvre par les micro-organismes du sol afin d'augmenter la disponibilité ainsi que l'acquisition du phosphore par les plantes (figure 3).

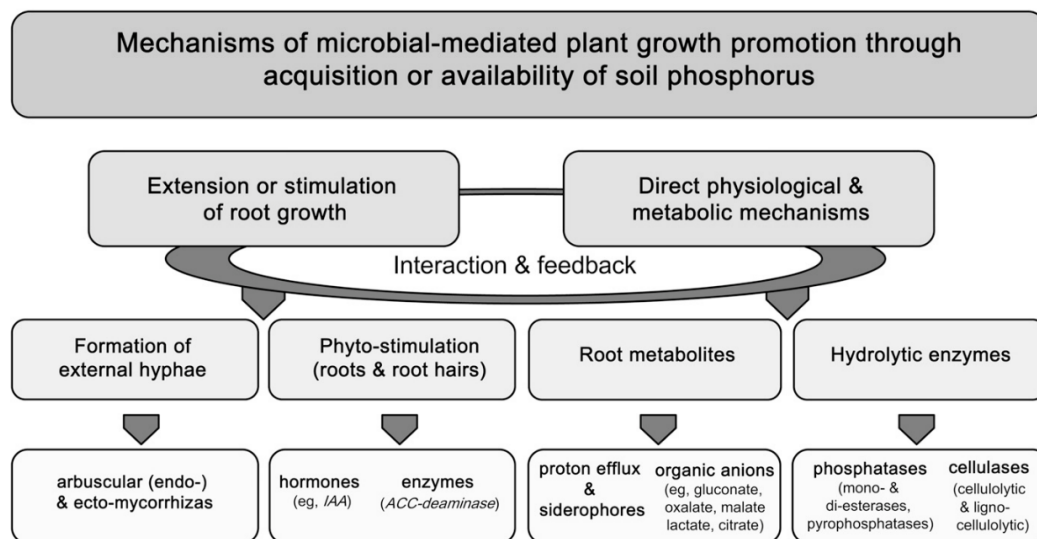


Figure 3. Différents mécanismes induits par les organismes vivants permettant d'augmenter la disponibilité du phosphore ou la capacité des plantes à l'acquérir dans les sols, tirée de Richardson et al., 2011

4.2.1. Composés promoteurs de la croissance

Les micro-organismes sont capables d'améliorer la capacité de la plante à acquérir du phosphore dans les sols en améliorant la croissance des racines. Premièrement, les organismes mycorrhiziens peuvent s'associer avec les racines afin de créer des extensions des racines existantes. Deuxièmement, les micro-organismes peuvent produire des phytohormones appelées « stimulatrices de la croissance des plantes ». Il y a cinq classes de ces phytohormones à savoir les auxines, les gibbérellines, les cytokines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir et al., 2001). La phytohormone auxine la plus active est l'acide indole 3-acétique (AIA). Cette hormone permet de

stimuler rapidement et à long terme la division cellulaire, la différenciation ainsi que l'élongation des cellules (Hayat et al., 2010). Elles peuvent également produire des enzymes altérant les précurseurs de l'éthylène comme la désaminase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate. En effet, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique est un précurseur de l'éthylène. Une quantité trop importante d'éthylène provoque une sénescence prématurée des organes végétaux ainsi qu'une abscission des feuilles (Davies, 2010; Hayat et al., 2010).

4.2.2. Mécanismes physiologiques et métaboliques directs

Les micro-organismes ont développé certains processus physiologiques et métaboliques qui ont un impact direct sur la solubilisation ainsi que la minéralisation du phosphore dans les sols à partir de phosphore inorganique insoluble ou du phosphore organique (Richardson et al., 2011).

Solubilisation du phosphate minéral

Une grande variété de bactéries a la capacité de solubiliser le phosphate inorganique dans les sols. Ces bactéries font partie des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter* ou encore *Erwinia* (Sperber, 2004).

L'aptitude des bactéries à solubiliser le phosphore inorganique est principalement due à leur capacité d'acidification de la solution du sol ainsi qu'au relargage d'ions organiques en solution (Khan et al., 2007). Les acides organiques sont des composés CHO présentant un faible poids moléculaire et caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupements carboxyles. Ils sont produits par les micro-organismes et les racines notamment lors d'un stress en fer, aluminium ou phosphore afin d'altérer et de solubiliser les minéraux. Les deux acides organiques les plus importants sont l'acide gluconique, produit par *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Illmer et al., 1992; Welch et al., 1993) et l'acide 2-ketogluconique, produit par *Rhizobium* et *Bacillus firmus* (Banik et al., 1982). D'autres acides organiques peuvent également être relargués comme l'acide malonique, oxalique, citrique et succinique pour les plus importants (Banik et al., 1982; Jones, 1998). Certains acides inorganiques sont également produits comme l'acide sulfhydrique, nitrique ou carbonique, mais en moindre quantité (Sperber, 2004).

De nombreuses expériences ont déjà démontré l'efficacité de l'inoculation de telles bactéries sur la croissance et la nutrition phosphatée des plantes (Rodríguez et al., 2006; Khan et al., 2007; Zaidi et al., 2007). En présence d'acides organiques, la concentration en orthophosphates est 10 à 100 fois supérieure dans la solution du sol en fonction du type de sol et de la concentration des acides organiques (Earl et al., 1979).

Le premier mécanisme de solubilisation du phosphore inorganique est l'acidification de la solution du sol. L'acidification est due à la libération de protons au niveau des parois externes en échange du prélèvement de cations par l'ATPase (Rodríguez et al., 2006). Les acides organiques libérés par les bactéries libèrent également des protons. L'acidification du milieu entraîne un déséquilibre dans les sols ainsi qu'un changement de solubilité de certains minéraux, menant à leur dissolution comme les tri-calcium phosphates dans les sols calcaires (Nisha et al., 2014). Les protons peuvent substituer les cations à la surface des minéraux phosphatés du sol afin de mener à leur dissolution et à une solubilisation des ions orthophosphates (Duff et al., 1959).

Le second mécanisme est la production d'anions organiques issus des acides organiques déprotonés. Premièrement, les anions organiques sont capables de désorber les ions phosphates adsorbés à la surface de minéraux, principalement à la surface des oxydes de fer et d'aluminium ou des roches phosphatées. En effet, ces anions peuvent remplacer les ions phosphates par une réaction d'échange de ligands (Lan et al., 1995). Ensuite, ces derniers peuvent dissoudre les minéraux phosphatés par remplacement des ions phosphates par les anions organiques. Les anions organiques se chélatent alors aux cations métalliques Al^{3+} , Fe^{3+} et Ca^{2+} , notamment au niveau des oxydes de fer et des carbonates de calcium (Duff et al., 1959). Les bactéries *Pseudomonas* produisent également des sidérophores ayant une grande affinité avec les ions ferriques et formant des complexes avec les ions ferriques, pouvant provoquer la dissolution des oxydes de fer (Kraemer et al., 1999). Le type de ligand ainsi que le nombre de groupements carboxyles et leur arrangement déterminent la stabilité des complexes formés. Les tricarboxylates comme le citrate³⁻ chélatent les cations plus fortement que les dicarboxylates comme l'oxalate²⁻ ou la malate²⁻. Enfin, les anions organiques entrent en compétition avec les orthophosphates pour les sites de liaison dans les sols (Ryan et al., 2001).

Minéralisation et solubilisation du phosphate organique

La minéralisation du phosphore organique est généralement réalisée par des enzymes phosphatases produites par diverses bactéries, mais également par les plantes (Kirchner et al., 1993, Rodríguez et al., 1999). L'activité des phosphatases augmente en réponse à un déficit en phosphore dans le milieu. Ces enzymes sont capables de minéraliser le phosphore organique provenant de sources variées par des réactions de déphosphorylation reprenant l'hydrolyse des liens phosphoesters (Richardson et al., 2011). L'activité de ces dernières peut minéraliser jusqu'à 60% du phosphore organique total dans les sols (Bünemann, 2008).

Les phytates sont des composés organiques phosphorés formés à partir d'acide phytique lié à certains métaux comme le fer. Les phytates sont la principale source de phosphore organique dans les sols. Les phytases sont des phosphatases spécifiques, minéralisant les phytates. Les phytases permettent un plus grand relargage d'orthophosphates dans la solution du sol que les phosphatases (Greaves et al., 1965; Cosgrove et al., 1970).

De nombreux genres de bactéries produisent des phosphatases à savoir les bactéries *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* ainsi que les *Pseudomonas* et *Bacillus* (Gugi et al., 1991). Les enzymes microbiennes montrent une plus grande efficacité au niveau du relargage d'orthophosphate biodisponible que les enzymes végétales (Tarafdar et al., 2001).

D'autres types d'enzymes que les phosphatases sont également produites à savoir les cellulases. Les cellulases permettent de dégrader par hydrolyse la cellulose présente au niveau des résidus organiques et de la matière organique afin de minéraliser le phosphore organique (Demain et al., 2005).

4.3. Mobilisation du fer

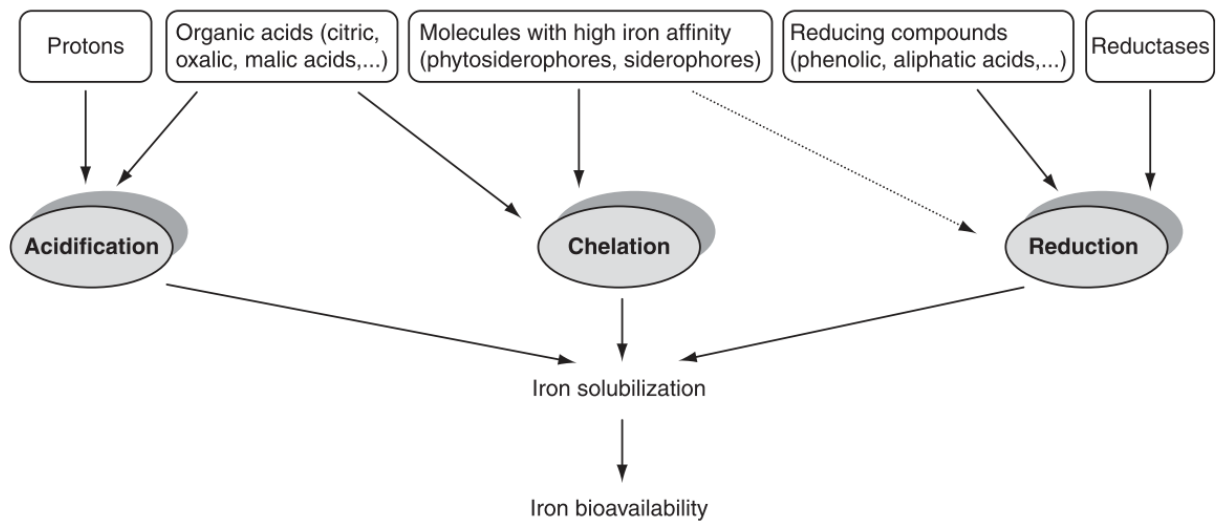


Figure 4. Différents mécanismes induits par les organismes vivants engendrant une augmentation de la solubilisation et de la disponibilité du fer dans les sols, tiré de Robin et al., 2008

En raison d'une faible disponibilité du fer dans les sols, les micro-organismes ainsi que les plantes ont développé des stratégies d'acquisition du fer dont les principales sont représentées à la figure 4. Les trois mécanismes les plus importants dans l'acquisition du fer sont l'acidification, la chélation ainsi que la réduction. Ces trois mécanismes contribuent à l'augmentation de la dissolution et de la solubilité des oxydes de fer (Robin et al., 2008).

L'efficacité de ces trois mécanismes dépend du pH et diminue lorsque le pH augmente. De plus, le mécanisme de réduction est le plus important dans la mobilisation du fer que la complexation et en dernier, de la protonation (Furrer et al., 1986).

4.3.1. Acidification

L'acidification des sols provient de la libération de protons et par production d'acides organiques par les plantes et les micro-organismes. La concentration en protons peut atteindre une valeur 100 x supérieurs dans la rhizosphère que dans le sol brut (Hinsinger et al., 2003). La diminution du pH des sols permet d'augmenter la solubilité des oxydes de fer présent au sein des sols (Kraemer et al., 2006). De plus, l'acidification entraîne la protonation des groupements hydroxyles ou des oxygènes de coordination des ions ferriques à la surface des oxydes de fer. Cette protonation entraîne de plus faibles liaisons des ions ferriques et peut mener à une dissolution des oxydes de fer. L'acidification entraîne donc une dissolution par les protons (Kraemer, 2004). Cependant, la dissolution induite par les protons atteint un minimum à pH neutre ou alcalin des sols où elle peut être considérée comme négligeable (Cheah et al., 2003).

La respiration microbienne et végétale entraîne un relargage de protons par dissociation de l'acide carbonique (H_2CO_3) produit, favorable à pH neutre et alcalin. La respiration a un impact particulièrement important dans les sols calcaires ayant un pH proche de 8 (Hinsinger et al., 2003). Les protons peuvent être relargués par l'activité des ATPases qui augmentent lorsqu'un déficit en fer est présent (Santi et al., 2005). Les acides organiques, citrate, oxalate et malate principalement, diminuent également le pH par libération de protons. La concentration de ces

acides organiques dans la rhizosphère peut aller de 50 à 9000 μM et dépend du déficit présent en fer et en phosphore (Jones et al., 1996; Jones, 1998). Les acides organiques microbiens entraînent une augmentation du taux de dissolution des silicates ainsi que des minéraux ferriques (Bennett et al., 2001).

4.3.2. Réduction

La réduction des ions ferriques et ions ferreux est indispensable au prélèvement du fer pour les plantes utilisant la stratégie I, à savoir les non-graminées. Les plantes produisent des réductases, dont l'activité est stimulée en réponse à un manque de fer. L'activité des réductases au sein de la membrane plasmique est engendrée par l'extrusion de protons dans la rhizosphère (Guerinot et al., 1994). Des composés réducteurs comme les composés phénoliques et les acides carboxyliques sont également produits par les racines (Römheld et al., 1983). La réduction microbienne des ions ferriques est également réalisée par des réductases produites par certaines bactéries pathogènes comme *Escherichia coli* ou encore *Pseudomonas aeruginosa* (Coward, 2002).

4.3.3. Chélation

Une stratégie principale dans l'acquisition du fer est la production de molécules chélatrices, appelées ligands. Ces ligands peuvent posséder une très forte affinité avec les ions ferriques comme les sidérophores ou une plus faible affinité comme les anions organiques carboxylates, oxalate, citrate, malate ou encore ascorbate (Jones, 1998; Reichard et al., 2007). En effet, la présence d'acides organiques entraîne de faibles concentrations en fer dissous provenant de la goethite. L'addition de sidérophores permet une dissolution rapide du fer labile présent à la surface de la goethite.

La chélation des ions ferriques engendre une cinétique de labilisation des liens retenant les ions ferriques et mène à une dissolution contrôlée par les ligands (Kraemer et al., 1999).

À la surface des oxydes, les ions ferriques sont partiellement coordonnés par le réseau cristallin et donc partiellement adsorbés à la surface par des groupements hydroxyles OH^- ou des molécules d'eau. Le processus de dissolution des oxydes s'explique comme un échange progressif des partenaires de coordination des ions ferriques qui passent de la structure cristalline de l'oxyde aux ligands adsorbés à la surface. Le taux de dissolution dépend donc de la réaction d'échange des ligands à la surface des oxydes. Un ligand est efficace dans la dissolution des oxydes s'il a une grande tendance à être adsorbé et à former des complexes de surface avec le fer (Kraemer, 2004).

Un mécanisme généralisé de dissolution des oxydes de fer contrôlée par les ligands a été proposé (Furrer et al., 1986) :

- 1) Formation rapide d'un complexe de surface par un mécanisme d'échange de ligand
- 2) Phase lente déterminant la vitesse de détachement du centre métallique de la surface des oxydes de fer
- 3) Régénération rapide de la surface. Le ligand adsorbé influence le taux de dissolution en déstabilisant les ions ferriques coordonnés à la surface des oxydes ce qui facilite la rupture des liens pour la dissolution.

Le taux de dissolution contrôlée par les ligands, sidérophores ou acides organiques, dépend de la concentration de surface en ligands sur les oxydes de fer ainsi que du taux de saturation en ligands de la solution (Kraemer et al., 1997). Le pH affecte également la dissolution contrôlée par les ligands. En effet, un changement de pH entraîne un changement au niveau de la concentration et la protonation des ligands en solution. À un pH supérieur à 5, la dissolution par protons a été trouvée négligeable par rapport à la dissolution contrôlée par les ligands (Cheah et al., 2003). En effet, la dissolution du pool labile de fer à la surface des oxydes est contrôlée majoritairement par les ligands (Reichard et al., 2007).

La chélation avec des ions en solution permet d'accélérer indirectement le taux de dissolution des minéraux en créant un déséquilibre de la concentration en cations en anions dans la solution (Welch et al., 2002).

Acides organiques

Le degré de complexation des acides organiques avec les ions ferriques dépend du nombre de groupements carboxyles, de la concentration en acides organiques et du pH du sol. Le malate, le citrate ainsi que l'oxalate ont une très forte affinité avec les cations trivalents comme le Fe^{3+} et l' Al^{3+} . De plus, la capacité des acides organiques à former des complexes diminue avec l'augmentation du pH (Jones, 1998). Le fer capté par ces acides organiques provient majoritairement d'oxydes de fer comme la goethite ou la ferrihydrite dans les sols tempérés.

Les acides organiques s'adsorbent à la surface des oxydes de fer et complexent les ions ferriques de la matrice. La matrice déstabilisée, les complexes formés se détachent de la goethite. Les acides organiques forment des complexes solubles avec les ions ferriques (Jones, 1998).

Cependant, ces complexes ne sont pas prélevables par les organismes du sol. Les sidérophores peuvent dès lors complexer les ions ferriques, initialement liés aux acides organiques afin d'être prélevés par les organismes (stratégie II d'acquisition du fer par les plantes). En effet, les constantes de stabilité des complexes formés sont plus faibles que celles des sidérophores et vont de 10^7 à 10^{11} en fonction du type acide organique (Hue et al., 1986; Jones, 1998). Ces complexes peuvent également être réduits en ion ferreux afin de relarguer des ions ferreux solubles en solution et prélevables par les plantes (stratégie I d'acquisition du fer par les plantes). Dans les deux cas, l'acide organique est ensuite recyclé.

Les anions organiques sont également capables de complexer d'autres cations comme les Ca^{2+} dans les sols calcaires, réduisant ainsi leur capacité à lier le fer (Jones, 1998).

Les acides organiques en plus de leur rôle au niveau de l'acquisition des nutriments par les plantes et les micro-organismes ont également un impact sur la détoxification des métaux, la réduction du stress anaérobie, l'altération des minéraux ou encore l'attraction d'agents pathogènes (Jones, 1998).

L'ascorbate et l'oxalate sont des ligands organiques retrouvés naturellement dans les sols à des concentrations allant du micromolaire au millimolaire (Jones, 1998). Une attention particulière sera accordée à ces deux ligands dans la suite de ce travail et particulièrement à leur effet sur la dissolution de la goethite. L'oxalate est un ligand à faible poids moléculaire retrouvé dans la

majorité des sols. Sa concentration dans les systèmes naturels va de $2,5 \cdot 10^{-5}$ à $4 \cdot 10^{-3}$ M (Vance et al., 1996).

Sidérophores

En présence d'une carence en fer, les bactéries ainsi que les graminées sont capables de synthétiser des sidérophores afin d'acquérir le fer. Les sidérophores sont des ligands organiques de faible poids moléculaire présentant une grande affinité et spécificité aux ions ferriques. L'efficacité des différents ligands dépend de leur affinité et de leur spécificité des ions ferriques. Plus les complexes formés entre les ligands et le fer sont stables, plus le ligand aura une grande affinité. Les sidérophores microbiens ont une plus grande affinité pour les ions ferriques que les phytosidérophores (Kraemer et al., 2006). En effet, les constantes de stabilité des complexes formés entre les ions ferriques et les sidérophores microbiens ou les phytosidérophores sont de respectivement 10^{23} à 10^{52} et 10^{18} (Neilands, 1981, 1995; Meyer, 2000; Ams et al., 2002). Cependant, cette affinité plus faible est compensée par certaines plantes par une exsudation plus importante de sidérophores, notamment chez les graminées (Romheld, 1991). Les constantes de stabilité élevées permettent aux sidérophores de se lier aux ions ferriques complexés en brisant les liens existants. En effet, la constante de stabilité des complexes formés avec l'acide humique ou l'oxalate n'est que de 10^{13} et 10^8 respectivement (Takahashi et al., 1997). Les complexes sidérophores ont également une plus grande constante de stabilité que les complexes formés avec l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) de 10^{25} . Pourtant, l'EDTA est un chélateur artificiel du fer utilisé en agriculture pour lutter contre les carences (Lucena, 2000). Les sidérophores peuvent alors engendrer des réactions d'échanges de ligands par chélation des ions ferriques, initialement complexés au niveau des oxydes, de substances humiques ou d'autres anions organiques (Kraemer et al., 2006; Fardeau et al., 2011). La capacité des sidérophores à complexer les ions ferriques leur permet également de dissoudre les oxydes de fer comme la goethite en augmentant le taux de dissolution par les ligands (Reichard et al., 2007). Les complexes sidérophore-ion ferriques sont directement prélevables par les organismes ayant les récepteurs adéquats.

Le présent travail s'intéresse particulièrement à l'effet de la production de sidérophores microbiens sur la dissolution de la goethite ainsi qu'à la co-solubilisation du fer et du phosphore biodisponible. La section suivante présente un aperçu plus détaillé sur les sidérophores.

5. Sidérophores

La grande compétition pour le fer a entraîné une évolution des mécanismes de prélèvement du fer au sein de la cellule. Les bactéries se sont adaptées et ont produit des sidérophores capables d'acquérir le fer à partir de formes insolubles, majoritairement à partir des oxydes de fer, mais également d'autres formes comme le citrate ferrique, le phosphate ferrique, les complexes Fe-transferrine, le fer lié aux sucres ou encore les glycosides. De plus, les sidérophores sont également capables de complexer le fer provenant de complexes avec d'autres ligands, mais également le fer lié à des enzymes, le fer relâché lors de la décomposition des cellules microbiennes et végétales ou encore le fer lié à la substance humique du sol (Kraemer, 2004). Les sidérophores peuvent également acquérir le fer à partir de chélateurs artificiels comme l'EDTA (Zaidi et al., 2009).

Différentes espèces de bactéries synthétisent des sidérophores à savoir *Shingomonas*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Azobacter*, *Pseudomonas* ou encore *Streptomyces* (Uroz et al., 2009).

Les concentrations en sidérophores dans la plupart des environnements naturels sont très basses. Dans la solution du sol, les concentrations en sidérophores retrouvées dépendent fortement de l'horizon de sol considéré. De plus grandes concentrations sont présentes au niveau de la rhizosphère (Nelson et al., 1988). Le pH du sol au niveau de la rhizosphère va également jouer un rôle dans la production de sidérophores. La concentration en sidérophore hydroxamate dans la solution du sol a été estimée entre 10^{-7} et 10^{-8} M (Powell et al., 1980). Une concentration retrouvée naturellement pour les sidérophores produits par les *Pseudomonas* dans les sols est de 240 μ M. Cependant, une très grande gamme de concentration peut être retrouvée dans les sols allant de dizaine de micromoles à quelques millimoles (Hersman et al., 1995).

Les sidérophores peuvent également avoir un rôle de biocontrôle, de bioremédiation, d'amélioration de la croissance des plantes et d'altération des minéraux en plus de son rôle d'agents chélatants (Ahmed et al., 2014). Les sidérophores vont principalement complexer le fer, mais peuvent aussi complexer d'autres éléments comme le manganèse, le cobalt ou encore le nickel afin de les rendre disponibles pour les cellules microbiennes et végétales (Braud et al., 2009). Les bactéries produisant des sidérophores ont donc un gros avantage dans des conditions de déficit en fer et excluent ainsi les pathogènes (Zaidi et al., 2009).

Plus de 500 sidérophores microbiens ont déjà été caractérisés (Boukhalfa et al., 2002) dont 100 différentes pyoverdines (Budzikiewicz, 2004; Meyer et al., 2008). Les sidérophores sont classés selon leurs groupements fonctionnels : catécholates, hydroxamate, hydrocarboxylates, aminocarboxylates (Winkelmann, 2002).

5.1. Diversité

Les sidérophores sont définis par leurs affinités et leurs spécificités pour le fer ainsi que par leurs fonctions d'acquisition du fer, mais pas par leurs structures chimiques. Cependant, l'ensemble des sidérophores présente des points communs au niveau de leurs structures (Boukhalfa et al., 2002). Tout d'abord, la masse moléculaire se situe majoritairement entre 500 et 1500 daltons. De plus, les sidérophores sont divisés en classes selon leurs structures chélatantes. La plupart des sidérophores font partie de la classe des hydroxamates ou des catécolates. D'autres groupes sont retrouvés dans la littérature comme les carboxylates ou les pyoverdines. Les groupements permettant de lier les ions métalliques sont les α -hydroxycarboxylate, hydroxamate, catécholate et moins fréquemment les carboxylates (figure 5).

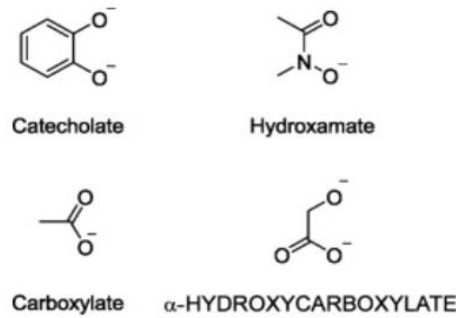


Figure 5. Différentes structures chélatantes présentes au niveau des sidérophores (Raines et al., 2015).

La plupart des sidérophores sont des ligands hexadentés formant des complexes 1:1 avec les ions ferriques (Spasojevic et al., 1999).

5.2. Mécanisme d'action

Les sidérophores hydroxamates forment des complexes avec les ions ferriques par une liaison bidentée avec le groupe carboxyle et hydroxylamine donnant ainsi un cycle à 5 chaînons. Les sidérophores catécholates forment également un cycle à 5 membres avec les ions ferriques grâce aux deux oxygènes phénoliques après déprotonation (Kraemer, 2004).

Le mécanisme d'action des sidérophores peut être décomposé en trois parties (figure 6). Tout d'abord, les sidérophores sont synthétisés au niveau intracellulaire des organismes et sont relâchés dans le milieu environnement par exsudation extracellulaire. Ensuite, très instable dans la solution, les sidérophores vont aller complexer dans un rapport 1 :1 les ions ferriques présents au niveau des minéraux ferreux, principalement les oxydes de fer. Les complexes vont alors se détacher, provoquant la déstabilisation ou la dissolution de ces minéraux. Enfin, les complexes fer-sidérophores très stables et solubles vont être reconnus par des récepteurs au niveau des membranes externes des organismes vivants et être transportés à l'intérieur de la cellule (Boukhalfa et al., 2002; Kraemer, 2004).

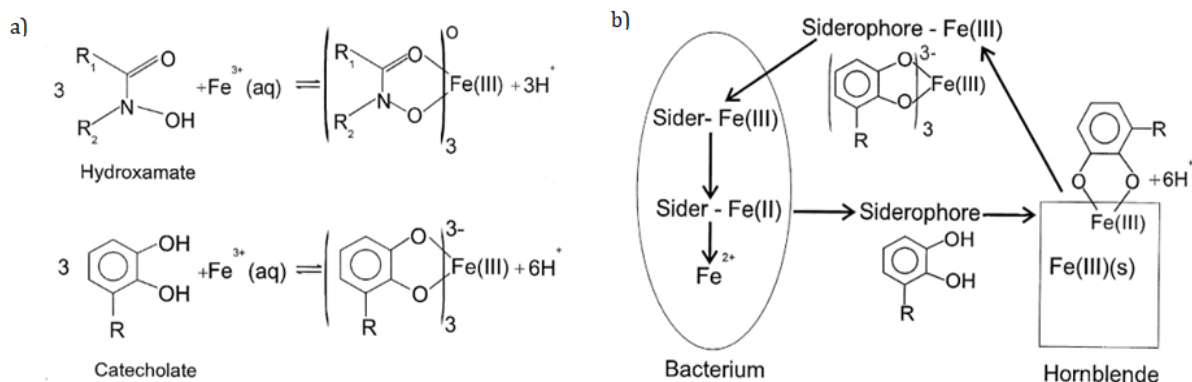


Figure 6. Représentation a) de la réaction de complexation entre un sidérophore hydroxamate et catécholate avec un ion ferrique et b) du mécanisme d'action des sidérophores excrétés par les bactéries du sol en présence de la hornblende, tirée de Kalinowski et al., 2000

L'entièreté du complexe sidérophore ferrique est prélevée par la cellule végétale des graminées ou microbiennes. À l'intérieur de la cellule, le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} afin d'être utilisé par la cellule. Le sidérophore est alors soit recyclé soit hydrolysé (Neilands, 1995; Kalinowski et al., 2000).

5.3. Dissolution des oxydes de fer

Les sidérophores présentent une activité de dissolution des oxydes et de solubilisation du fer par échange de ligands (Reichard et al., 2007).

Hersman et al., (1996) ont prouvé l'effet des sidérophores sur l'acquisition du fer par les bactéries. En effet, dans un milieu en déficit en fer, l'ajout d'oxyde de fer entraîne une hausse de la croissance des bactéries *Pseudomonas sp.* Cette meilleure croissance est due à une acquisition du fer grâce à la production de sidérophores. Les sidérophores permettent une augmentation de la solubilité des oxydes par la formation de complexes avec les ions ferriques (Kraemer, 2004)

Plusieurs facteurs influencent l'efficacité des ligands. Plus la constante de stabilité des complexes Fe-sidérophore est grande, plus les sidérophores seront efficaces dans la solubilisation du fer pour une même concentration. De plus, une augmentation de la concentration en ligands engendre une augmentation en fer soluble dans la solution ainsi qu'un plus haut taux de dissolution des oxydes de fer (Liermann et al., 1999). Cependant, à partir d'une certaine concentration en ligands, un plateau au niveau du taux de solubilisation du fer est atteint, suggérant une saturation de l'adsorption des sidérophores à la surface de la goethite (Cervini-Silva et al., 2002). Plus la spécificité des ligands augmente, plus la concentration en fer soluble augmente également. En effet, la spécificité des ligands pour les ions ferriques par rapport à d'autres ions similaires comme Al^{3+} ou Ca^{2+} est due à une chélation préférentielle de l'ion ferrique et à la reconnaissance des complexes fer-sidérophores au niveau des récepteurs protéiques à la surface des cellules.

Un sidérophore de type hydroxamate peut augmenter le taux de relargage du fer, mais également celui de l'aluminium ou du silicium alors qu'un sidérophore de type catécolate n'a permis que l'augmentation du taux de relargage du fer dû à une plus grande sélectivité pour le fer. De plus, l'apport des deux sidérophores a permis de tripler le taux de dissolution des oxydes de fer, plus particulièrement de l'hornblende (Liermann et al., 1999).

Le taux de dissolution de la goethite dépend également de la concentration de surface des ligands. Pour une même concentration d'EDTA ou d'oxalate que de sidérophores, des taux de dissolution de la goethite plus grands sont observés pour l'EDTA et l'oxalate. En effet, l'EDTA et l'oxalate sont adsorbés à la surface de la goethite en plus grande quantité. En guise d'exemple, le maximum d'excès de surface du sidérophore desferrioxamine B est de $0,43 \cdot 10^{-7}$ mole. m^{-2} alors que le maximum d'excès de l'oxalate et de l'EDTA sont de respectivement $11 \cdot 10^{-7}$ mole. m^{-2} et $19 \cdot 10^{-7}$ mole. m^{-2} (Kraemer et al., 1999; Cheah et al., 2003).

De nombreuses études ont démontré l'implication de divers sidérophores produits par de nombreux genres sur la dissolution des oxydes de fer comme l'hématite, la goethite ou encore la hornblende pour les principaux (Hersman et al., 1995; Holmen et al., 1996; Liermann et al., 1999;

Hersman, 2000; Kalinowski et al., 2000; Yoshida et al., 2002; Kraemer et al., 2006). En effet, l'ajout de sidérophores entraîne une hausse très rapide du taux de dissolution des oxydes par dissolution contrôlée par les ligands (Reichard et al., 2007).

En présence de sidérophores et d'acides organiques comme l'oxalate, le taux de solubilisation du fer est plus élevé qu'en présence de sidérophores seuls. En effet, l'ajout d'oxalate entraîne un taux de dissolution de 2,5 fois supérieur. (Reichard et al., 2007). De plus, le taux de solubilisation du fer présente alors une valeur supérieure à la somme des taux de solubilisation individuels. L'oxalate, possédant une grande capacité d'adsorption à la surface de la goethite, détache des ions ferriques et crée des complexes en solution. Les sidérophores ont une plus grande affinité et spécificité avec les ions ferriques que les acides organiques. Une réaction d'échange de ligands des ions ferriques se produit entre l'oxalate et le sidérophore. L'oxalate libéré va alors s'adsorber à nouveau à la surface de la goethite afin de libérer une plus grande quantité d'ions ferriques. La présence des deux ligands permet également de garder la solution éloignée de la saturation en fer et ainsi permettre à la dissolution de continuer (Cervini-Silva et al., 2002, Reichard et al., 2007).

Le taux de solubilisation en fer par les sidérophores augmente avec la hausse du taux de substitution de l'aluminium (Cervini-Silva et al., 2002).

La solubilité des oxydes de fer présents en solution influence fortement la concentration en fer soluble. Une augmentation du pH entraîne une diminution de la solubilité des oxydes comme la goethite en absence de ligands. La présence de ligands permet d'augmenter la solubilité des oxydes de fer en solution. La présence de sidérophores augmente la solubilité de la goethite sur une grande gamme de pH allant de 3 à 9. L'oxalate a une très grande affinité pour les ions ferriques à faible pH et entraîne une plus grande solubilité de la goethite que certains sidérophores en dessous de pH 5. Au-dessus de pH 5, la solubilité de la goethite diminue drastiquement en présence d'oxalate avec un minimum de concentration en fer soluble atteint à pH 8. A pH 8, l'oxalate n'a pas d'effet sur la solubilisation de la goethite à une concentration inférieure à 1 mM (Kraemer, 2004).

6. Bactéries du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Enterobacter* sont les plus efficaces au niveau de l'augmentation du phosphore biodisponible pour les plantes dans les sols ainsi que de l'augmentation de la croissance et du rendement des cultures (Whitelaw, 1999; Khan et al., 2007). De plus, les *Pseudomonas* jouent un rôle de biocontrôle grâce à la production d'antibiotiques (phénazines, cyanide et 2,4-diacetylphloroglucinol), de lipopeptides cycliques ou encore de sidérophores (Biessy et al., 2019).

Les *Pseudomonas* sont des bactéries Gram-négatives colonisatrices de la rhizosphère et sont sélectionnées naturellement dans les milieux pauvres en fer, comme la majorité des sols tempérés, en raison d'un système d'acquisition performant en fer, les pyoverdines (Robin et al., 2008). En effet, afin d'acquérir le fer, les *Pseudomonas* produisent des sidérophores nommé pyoverdine (sidérophore primaire) et pyocheline (sidérophore secondaire). De plus, ces bactéries sont capables de capter des exosidérophores complexés avec du fer.

La production de sidérophores est très répandue chez les bactéries aérobies du genre *Pseudomonas*. Par exemple, sur 302 souches de *Pseudomonas* fluorescentes isolées à partir du sol, 297, à savoir 98% des souches sont capables de produire des sidérophores (Baggt et al., 1987).

Les *Pseudomonas* sont divisés en deux classes en fonction de leur caractère à produire ou non des pyoverdines, pigment jaune-vert fluorescent (Schalk et al., 1999). Le premier groupe est les *Pseudomonas* produisant des pigments fluorescents à savoir par exemple les *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou encore les *P. syringae*. Le deuxième groupe reprend les *Pseudomonas* ne produisant pas de pigments fluorescents à savoir par exemple les *P. alcaligenes*, les *P. fragi* ou encore les *P. mendocina*.

Les *Pseudomonas* sont capables de produire d'autres molécules semblables aux sidérophores comme la pyocheline, l'acide salicylique ou la quinolobactine, mais ces composés sont produits en beaucoup plus faible quantité (au moins dix fois inférieures) et présentent de plus faibles affinités avec le fer (Meyer et al., 1992; Mossialos et al., 2000).

Au niveau scientifique, une attention particulière est portée aux sidérophores principaux produits par les *Pseudomonas* fluorescents à savoir les pyoverdines (Meyer, 2000; Meyer et al., 2007).

6.1. Pyoverdine

La pyoverdine est le nom donné à l'ensemble des pigments fluorescents vert-jaune produits par les bactéries du genre *Pseudomonas sp.* en présence d'une carence en fer (Budzikiewicz, 1993). La synthèse est cependant réprimée lorsque les conditions ne présentent aucun stress en fer (Meyer, 2000). Ces molécules sont de puissants chélateurs du Fe^{3+} , mais également des transporteurs efficaces du fer. La pyoverdine a une constante de stabilité élevée de 10^{32} avec les ions ferriques (Meyer et al., 1978). Plus de 100 pyoverdines différentes ont déjà été identifiées à partir de différentes espèces et souches de *Pseudomonas*, ce qui représente 20% des sidérophores microbiens caractérisés (Meyer et al., 2008). L'apopyoverdine, à savoir la pyoverdine libre, à une fluorescence jaune-verte alors que la ferri-pyoverdine à une coloration brun foncé (Schalk et al., 1999).

La structure générale de la pyoverdine ainsi que du chromophore sont représentés à la figure 7. La pyoverdine est constituée de trois parties communes.

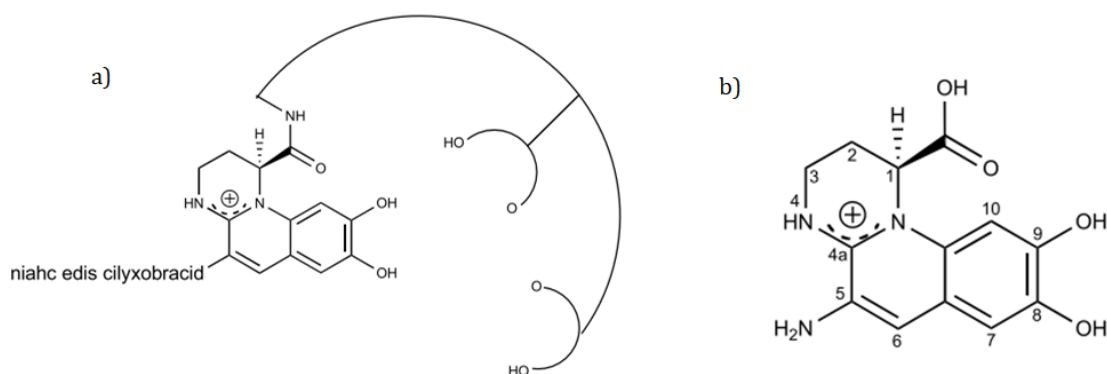


Figure 7. Représentation a) de la structure générale des pyoverdines et b) du chromophore, tiré de (Cezard et al., 2014)

La première est un chromophore, dérivé d'un 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline. Le chromophore est commun au niveau de toutes les pyoverdines et se lie aux ions ferriques par sa fonction catéchole. Le chromophore est responsable de la couleur et de la fluorescence de la pyoverdine en raison de son groupe phénolique.

La deuxième partie est un peptide spécifique du type de pyoverdine composé de 6 à 14 acides aminés. Cette chaîne peptique est attachée par son N. terminal au groupement carboxyle du chromophore. Dans la majorité des pyoverdines, le groupe carboxyle attaché au chromophore se situe en C1 (figure 6). Cette partie peut être linéaire ou cyclique, entièrement ou partiellement, et interagir avec le fer par ses deux fonctions hydroxamate et/ou alpha-hydroxycarboxylate (Cezard et al., 2014). La chaîne peptidique diffère parmi les souches de *Pseudomonas* par le nombre, la longueur, la composition et la configuration des acides aminés. Certains acides aminés de la chaîne peptidique sont impliqués dans la reconnaissance et dans la liaison du complexe Fe-pyoverdine avec les récepteurs à ferripyoverdine présents au niveau des membranes externes (Meyer, 2000).

Enfin, la troisième partie est une petite chaîne acyle latérale correspondant à un dérivé d'acide dicarboxylique liée en position C-3 au groupe NH_2 du chromophore. En fonction de la souche et des conditions de croissance, ce résidu peut-être sous la forme succinate, malate, amide ou glutamate (Meyer, 2000; Visca et al., 2007; Cezard et al., 2014). La chaîne latérale ne contribue pas à la chélation ou au transport du fer et n'a pas de fonctions chimiques ou biologiques connues. Cependant, cette partie joue un rôle lors de la biosynthèse de la pyoverdine (Budzikiewicz, 2004).

La structure chimique des pyoverdines montre trois sites chélatants bidentés incluant la fonction catécholate du chromophore et les deux fonctions hydroxamates de la chaîne peptidique. Les six donneurs d'atomes sont exclusivement des atomes d'oxygène. La pyoverdine se complexe dans un rapport 1 :1 avec un ion ferrique (Meyer, 2000). La pyoverdine, en se complexant, adopte une configuration octaédrale grâce à la combinaison des configurations D et L des acides aminés présents au niveau de la chaîne peptidique (Cezard et al., 2014).

Après la chélation avec les ions ferriques, le nouveau complexe Fe-pyoverdine est reconnu par un transporteur spécifique de la membrane externe des bactéries qui va laisser entrer le complexe dans la cellule où le fer sera relâché dans le périplasme. Ce transporteur est une protéine TonB dépendante. La pyoverdine est ensuite recyclée et à nouveau sécrétée dans le milieu extracellulaire par des pompes à flux.

Les pyoverdines peuvent également chélater d'autres cations métalliques comme l'aluminium, le manganèse, ou d'autres. Cependant, la constante d'affinité pour le Fe^{3+} est plus élevée que pour l'ensemble des autres métaux et seulement le fer est transporté efficacement (Cornelis, 2008).

6.2. Souche BTP1

La souche BTP1 est une souche de *Pseudomonas putida*. Cette souche ne produit qu'un seul type de sidérophore, à savoir la pyoverdine. L'apopyoverdine de BTP1 a une masse moléculaire de 1076 Da correspondant à la formule $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_{12}\text{O}_{20}$ tandis que la ferripyoverdine a une masse de 1129 Da correspondant aux remplacements de trois protons par un ion ferrique (Jacques et al., 1995). L'absorption maximale des apopyoverdines et des ferripyoverdines produites par BTP1 est obtenue à 400 nm avec un coefficient d'extinction molaire à pH 7 de $27.200 \text{ cm}^2.\text{mmol}^{-1}$ et $34.300 \text{ cm}^2.\text{mmol}^{-1}$ respectivement (Ongena, 1996).

La structure du chromophore de la pyoverdine de BTP1 est différente des pyoverdines généralement rencontrées. En effet, le groupe carboxyle du sidérophore est présent en position C-3 au lieu de C-1. La chaîne peptidique de la pyoverdine est donc liée au groupement carboxyle en C-3 plutôt qu'en C-1. Cette pyoverdine de BTP1 est appelée isopyoverdine (figure 8) (Jacques et al., 1995).

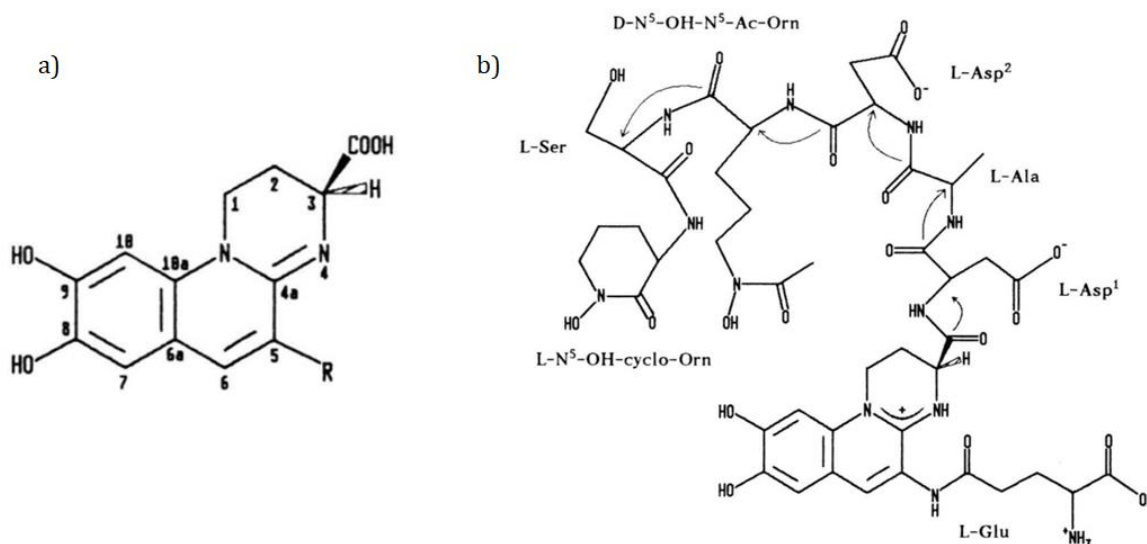


Figure 8. Structure a) du chromophore et b) de l'isopyoverdine de *Pseudomonas putida* BTP1

La différence de structure de l'isopyoverdine produite par BTP1 lui confère certaines propriétés.

Premièrement, cette différence explique la non-capacité des autres souches de *Pseudomonas* à prélever les ferripyoverdines de BTP1. En effet, les ferripyoverdine de BTP1 ne causent pas d'augmentation de croissance chez d'autres souches de *Pseudomonas* contrairement aux souches BTP2, 7, 9, 14 ou 16. Les ferripyoverdines des bactéries BTP1 ne sont prélevables que par elles-mêmes en raison d'un très faible taux de reconnaissance au niveau des récepteurs des souches étrangères. Cependant, les bactéries BTP1 sont capables de prélever les ferripyoverdines produites par d'autres souches de bactéries grâce à de multiples récepteurs au niveau de leurs membranes externes (Jacques et al., 1995; Ongena et al., 2002).

Deuxièmement, les isopyoverdines de BTP1 ont une plus grande affinité pour les ions ferriques que les pyoverdines classiques pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la constante de stabilité des ferripyoverdines de BTP1 est plus élevée que celle des complexes d'autres souches (Ongena et al., 2002). En effet, la constante de stabilité à pH 7 est de 10^{27} pour les complexes Fe-isopyoverdine de BTP1 et de 10^{26} pour BTP2, 16 ou 7 (Ongena et al., 2002). De plus, les complexes Fe-pyoverdine de BTP1 présentent une plus faible cinétique de décomplexation que les complexes formés par des pyoverdines classiques (Ongena et al., 2002).

La grande affinité pour les ions ferriques ainsi que la grande spécificité des récepteurs membranaires contribuent à augmenter le rôle nutritionnel de la pyoverdine. En effet, ces deux propriétés entraînent un avantage compétitif pour la ressource en fer limitée dans les sols ainsi que la suppression de champignons et d'autres bactéries pathogènes des plantes (Neilands, 1995).

III. Objectifs

Ce travail de fin d'études analyse l'effet des pyoverdines produites par *Pseudomonas putida* sur la dissolution de la goethite ainsi que sur la co-solubilisation du phosphore.

La recherche réalisée lors de ce travail a plusieurs objectifs.

Les objectifs principaux sont :

- Étudier l'effet des pyoverdines, isolées de la souche *Pseudomonas putida* BTP1, sur la dissolution de la goethite
- Évaluer l'impact des pyoverdines dissolvant la goethite sur la quantité de fer solubilisée ainsi que sur la quantité de phosphore co-solubilisée.

Les objectifs secondaires sont :

- Caractériser la goethite produite en termes de morphologie, de point de charge nulle, de surface spécifique et de composition élémentaire.
- Produire la quantité de pyoverdine de la souche *Pseudomonas putida* BTP1 nécessaire à la réalisation des expérimentations.
- Comparer l'effet de la pyoverdine sur la dissolution de la goethite et la co-solubilisation du fer et du phosphore en solution avec d'autres chélateurs à savoir l'oxalate et l'ascorbate.
- Analyser l'effet du pH et du temps de contact de la goethite avec les agents chélatants sur la dissolution de la goethite et la co-solubilisation du fer et du phosphore.

Différentes étapes sont nécessaires afin de répondre aux objectifs :

La première étape de ce travail consiste à produire de la goethite homogène, oxyde de fer synthétique, caractérisé par sa surface spécifique, sa morphologie, son point de charge nulle ainsi que sa composition élémentaire.

La deuxième étape comprend l'adsorption et le dosage des ions phosphates à la surface de la goethite à pH de 6 et de 8 afin de reproduire les conditions retrouvées dans des sols agricoles

Dans un troisième temps, différentes concentrations en fer et différents mutants de BTP1 sont testées afin d'obtenir un surnageant de la souche BTP1 contenant un maximum de pyoverdines et le même surnageant de BTP1 contenant un minimum de pyoverdine.

Dans la quatrième partie, les surnageants de BTP1, fortement et faiblement concentrés en pyoverdine à pH 6 et 8 seront mis en contact avec la goethite durant 8, 12 et 24 h afin d'analyser sa dissolution ainsi que la co-solubilisation du fer et du phosphore biodisponible. L'oxalate et l'ascorbate seront également mis en contact avec la goethite afin de comparer leurs effets.

IV. Matériels et méthodes

1. Production, caractérisation et préparation de la goethite

1.1. Production de goethite

Un seul type d'oxyde de fer est utilisé dans le cadre de ce travail, à savoir la goethite. Deux protocoles de production de la goethite sont testés.

1.1.1. Premier protocole (Schwertmann et al., 2000; Fernández-baca, 2010)

Afin de produire de la ferrihydrite, 180 ml d'une solution de KOH 5 M est ajouté rapidement à 100 ml d'une solution de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Chemlab, > 98%) 1 M sous agitation magnétique de 250 rpm (« round per minute » en anglais). Un précipité rouge brun de ferrihydrite se forme immédiatement (figure 9).



Figure 9. Etape intermédiaire de formation de ferrihydrite du premier protocole de production

Ensuite, l'ensemble de cette solution est dilué dans deux litres d'eau distillée. La solution est agitée pendant quelques minutes avant d'être chauffée 70 h à 70°C dans une étuve (Memmert, UN55). À la fin de cette période de chauffe, un précipité jaune-brun est présent dans la solution, résultant de la formation de goethite (figure 10). La solution est refroidie à température ambiante.



Figure 10. Formation de goethite lors du premier protocole de production

La solution est ensuite mise dans des membranes de dialyse Spectra/Por® 1, préalablement réhydratées pendant 30 minutes. Les sachets de dialyse sont mis dans un grand volume d'eau distillée. L'étape de dialyse prend fin lorsque le pH de l'eau distillée à savoir 6,3 est le même que le pH de l'eau contenant les sachets de dialyse, au départ de 12. Le pH des solutions est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (WTW™ ProfiLine™, pH 3210).

La solution de goethite est ensuite centrifugée 30 minutes à 10.000 rpm (Thermo Scientific™ Centrifugeuse Sorvall™ RC 6 Plus) et rincée trois fois à l'eau distillée. Enfin, les culots sont mis à l'étuve à 105°C pendant 48h.

La dernière étape est le broyage de la goethite produite. Un pilon et mortier en agate sont utilisés afin de broyer la goethite qui est ensuite passée sous un tamis de 125 µm et pesée. La goethite issue du premier protocole de production sera appelée « première goethite ».

1.1.2. Deuxième protocole (Atkinson et al., 1967; Villacís-García et al., 2015)

Une solution de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,15 M est préparée avec de l'eau ultra pure (Rephile, Direct Pure Up) bouillie. Ensuite, 200 ml de NaOH (Sigma, > 98%) 2,5 M sont ajoutés goutte à goutte à la solution de fer à une vitesse de 3,5 ml.min⁻¹ et sous agitation de 200 rpm. Après l'ajout des 200 ml, le pH doit être supérieur à 12, sinon du NaOH supplémentaire est ajouté. La solution est alors transférée dans un système sous atmosphère contrôlée au sein duquel l'air passe d'abord dans une solution de NaOH afin de neutraliser le CO₂ (figure 11). Le pH doit se maintenir à une valeur supérieure à 12.



Figure 11. Dispositif sous atmosphère contrôlée utilisé lors du deuxième protocole de production

La solution est agitée à 200 rpm pendant 30 min puis chauffée à 60°C pendant 24h. Enfin, la solution est dialysée, centrifugée et rincée selon le même protocole que la première méthode. La goethite est également séchée dans une étuve à 105°C pendant 48h et ensuite broyée à 125 µm. La goethite issue du deuxième protocole de production sera appelée « deuxième goethite ».

1.2. Caractérisation de la goethite

La goethite produite est caractérisée par la morphologie de ses cristaux, son point de charge nulle ainsi que par sa surface spécifique.

1.2.1. Morphologie et taille des cristaux de goethite

La morphologie ainsi que la taille des cristaux de goethite sont déterminées et étudiées grâce à un Microscope Electronique à Balayage Environnemental (MEBE) associé à un canon à émission de champ comme source d'électrons (FEG en anglais pour « Field Emission Gun ») travaillant à 15 kV. Le microscope MEBE-FEG provient de la Cellule d'Appui à la Recherche et à l'Enseignement de la Microscopie (CAREM) de l'Uliège et est un microscope Philips MEBE XL30 de 2000. Les

échantillons pour l'analyse MEBE-FEG sont préparés en dispersant de la poudre de goethite sur un ruban adhésif double face conducteur en carbone. Ensuite, ils sont recouverts d'une fine couche conductrice d'or grâce à un métalliseur Balzers MED010. Les images sont obtenues grâce à un détecteur d'électrons secondaires. Différentes zones des échantillons sont analysées et différents zooms sont réalisés afin de visualiser au mieux la morphologie des cristaux de goethite.

1.2.2. Point de charge nulle de cristaux de goethite (Calvete et al., 2009)

Des quantités de 20 ml de NaCl 0,05 M sont ajustées à des pH allant de 2 à 10 par l'ajout de HCl ou de NaOH 0,1 M. Le volume des falcons est ensuite porté à 30 ml par l'ajout de la solution de NaCl. Le pH à cet instant, appelé pH initial, est mesuré précisément pour chaque falcon.

Une quantité de goethite pure de 50 mg est pesée et ajoutée à chaque solution qui sont ensuite agitées vigoureusement pendant 5 min puis laissées droit et au repos 48 h afin que l'équilibre s'établisse. Après 48 h, les falcons sont centrifugés 10 minutes à 5.000 rpm afin de récupérer le surnageant. Le pH des surnageants, appelés pH final, sont mesurés.

La différence de pH (ΔpH) entre le pH final et le pH initial est calculée afin d'obtenir le delta pH. Ensuite, la courbe du delta pH en fonction du pH initial est tracée. Le point de charge nulle des cristaux de goethite est le pH initial pour lequel le delta pH est égal à zéro. Le point de charge nulle est déterminé par interpolation du pH initial entre les deux points de la courbe positifs et négatifs les plus proches du delta zéro.

1.2.3. Surface spécifique des cristaux de goethite

La surface spécifique de la goethite est déterminée grâce à la méthode de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer et al., 1938). Cette méthode consiste en une analyse de l'adsorption d'azote à la surface des cristaux de goethite. Cette analyse est réalisée en triplicat par le laboratoire du département de chimie appliquée : nanomatériaux, catalyse et électrochimie de l'Uliège. L'appareil utilisé est un Sorptomat 1990 de Thermo Fisher Scientific Inc.

1.3. Préparation de la goethite

Afin d'être utilisée dans les expériences de solubilisation du phosphore, la goethite est sorbée avec des ions phosphates. Deux protocoles d'adsorption d'ions phosphates sont utilisés en fonction du type de goethite, la première ou la deuxième goethite.

1.3.1. Adsorption d'ions phosphates sur la première goethite (Braun et al., 2019)

Quatre solutions de KH_2PO_4 (VWR, rectapur > 99%) à des concentrations de 10 et 50 milligrammes de phosphore par litre de solution (mg P.l^{-1}) et à pH 6 et 8 sont préparées avec de l'eau ultra pure. Le pH est ajusté à l'aide de HCl ou de NaOH 0,1 M. Deux durées de contacts entre les solutions de phosphates et la goethite sont testées à savoir 6 h et 24 h.

Dans chaque fiole, 100 ml de solution de phosphate sont mis en contact avec 0,3 g de goethite afin d'obtenir une concentration en goethite de 3 g.l^{-1} . Des fioles différentes sont réalisées pour les heures 6 et 24. L'ensemble des fioles sont mises sous agitation à 150 rpm afin de maximiser le contact entre la goethite et les ions phosphates.

Le contenu des fioles est ensuite filtré sur du 0,2 µm (Pall Laboratory, membrane disque Supor® en polyethersulfone (PES)). La goethite est récupérée en lavant le filtre et en mettant la goethite récupérée au four à 105°C pendant 24h. Le surnageant est quant à lui analysé à l'ICP-OES (Varian, Vista-MPX CCD Simultaneous ICP-OES) afin de doser le fer et le phosphore en solution. La quantité de phosphore adsorbé sur la goethite peut alors être déduite par différence entre la quantité de phosphore dans la solution initiale et dans la solution après contact avec la goethite.

1.3.2. Adsorption d'ions phosphates sur la deuxième goethite

Deux solutions de KH_2PO_4 à une concentration 2,7 g P.l^{-1} sont préparées en diluant 12 g de KH_2PO_4 dans un litre d'eau ultra pure. Le pH des deux solutions est ajusté à 6 et à 8 à l'aide de solutions de HCl et de NaOH 0,1 M. Dans des fioles de 500 ml, 13 g de goethite est ajouté à 200 ml de la solution de KH_2PO_4 pour les deux pH. Les deux fioles sont ensuite mises sous agitation à 150 rpm durant 35 h. La goethite est ensuite filtrée sur du 0,2 µm. Les différents filtres utilisés sont lavés à l'eau ultra-pure afin de récupérer la goethite. Cette dernière est ensuite séchée dans un four à 105 °C pendant 24 h. Après séchage, la goethite est à nouveau broyée à 125 µm. La solution de base en KH_2PO_4 ainsi que le surnageant récupéré après les 35 h de contact avec la goethite sont analysés à l'ICP-OES afin de doser le phosphore. La différence des concentrations permet de déduire la quantité de phosphore adsorbé sur la goethite. De plus, une attaque tri-acide est réalisée sur la goethite afin de quantifier le phosphore adsorbé à sa surface (voir point 1.4. de la section IV).

La moitié de la deuxième goethite n'est pas mise en contact avec la solution de KH_2PO_4 . Dans la suite de ce travail, cette goethite sera appelée « goethite pure ». Le reste de la deuxième goethite ayant subi une adsorption d'ions phosphates à pH 6 ou à pH 8 sera appelé « goethite sorbée ».

1.4. Détermination de la composition élémentaire de la goethite

Les trois types de goethite, à savoir la goethite pure, la goethite sorbée à pH 6 et la goethite sorbée à pH 8, sont caractérisés.

Les différents éléments sont extraits triplicat par attaque tri-acide. Pour cela, 0,5 g de goethite est pesé dans des creusets en platine. Un blanc sans goethite est également réalisé. Les creusets sont portés à 450 °C durant 4h. Ensuite, ils sont disposés dans un bain de sable à 250 °C et à deux reprises, 5 ml d'HF et 1,5 ml d' HClO_4 sont ajoutés aux creusets. Après évaporation complète des deux acides, 10 ml d'HCL 10% sont ajoutés. Après dissolution de la goethite dans l'HCL, la solution est transvasée dans un ballon de 50 ml et portée au trait avec de l'eau distillée. Les 50 ml sont alors passés sur des filtres Whatman 602 H ½.

Les différentes solutions sont dosées en 8 éléments à savoir le sodium (Na), le potassium (K), le magnésium (Mg), le calcium (Ca), le fer (Fe), l'aluminium (Al), le silicium (Si) et le phosphore (P). Les dosages sont effectués au moyen de l'ICP-OES. Les longueurs d'onde utilisées pour le dosage de chaque élément sont montrées dans le tableau 1.

Tableau 1. Longueurs d'ondes utilisées pour le dosage des éléments à l'ICP-OES

	Na	K	Mg	Ca	Fe	Al	Si	P
Longueur d'onde (nm)	588,995	766,491	279,553	396,847	259,94	396,152	288,158	213,618

2. Production et caractérisation des solutions de sidérophores

2.1. Souche, milieux et cultures

2.1.1. Souche de *Pseudomonas*

Une seule souche de *Pseudomonas* est utilisée dans ce travail à savoir la souche *Pseudomonas putida BTP1*. La souche de *Pseudomonas BTP1* est isolée par le département de Phytopathologie de la faculté agricole de Gembloux à partir de la rhizosphère d'orge. Cette souche est présente dans la collection de bactéries du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) à Liège. Cependant, dans le cadre de ce travail, la souche BTP1 est reprise d'un cryotube provenant de la collection du laboratoire « Microbial processes and interactions » (MiPI) de l'université de Gembloux Agro-Bio Tech.

2.1.2. Milieux de culture

Trois milieux de culture sont utilisés à savoir le milieu King B (KB), le milieu Casamino Acid (CA) et le milieu Succinate (Succ). Ces milieux sont sélectionnés en raison de leur faible teneur en fer permettant la production de pyoverdines. Le pH des milieux est toujours ajusté à 7 à l'aide de NaOH ou HCl 0,1 M. Les milieux sont réalisés avec de l'eau ultra pure et sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes avant leur utilisation.

- **Milieu KB**

Peptone	20 g/l
K ₂ HPO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/l
Glycérol	10 ml/l
Agar (si milieu solide)	20 g/l

- **Milieu CA**

Acide Casamino	5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,9 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g/l

- **Milieu Succ**

K ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
Succinate	4 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,036 g/l

2.1.3. Cultures de la souche BTP1

La souche de BTP1 utilisée est conservée à -80°C dans une solution d'eau peptonée-glycérol (80 :20 V/V).

Avant chaque culture, une préculture solide et une préculture liquide sont réalisées à 30°C durant 24 h sous une agitation orbitale de 150 rpm. La préculture liquide permet ensuite une inoculation des cultures à 0,05 de densité optique (DO) à 600 nm (VWR, V-1200 Spectrophotometer). L'ensemble des stérilisations est effectué à 121°C pendant 20 min.

2.2. Dosage de la concentration en cellules et en pyoverdine

Les cellules dans BTP1 sont quantifiées par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm au spectrophotomètre (VWR, V-1200 Spectrophotometer). La DO est ensuite multipliée par le facteur de conversion de la DO à 600 nm en concentration massique des cellules de BTP1 (mg cellules.l⁻¹). Ce facteur a été déterminé au point 2.3. de la section IV.

Les pyoverdines sont quantifiés par le spectrophotomètre à 400 nm, car les pyoverdines de la souche BTP1 possèdent un maximum d'adsorption à 401 nm et les ferripyoverdines à 396 nm à pH7 (Ongena, 1996).

Les concentrations molaires de pyoverdine et de ferripyoverdine sont obtenues par division de la densité optique à 400 nm [/] par les coefficients d'extinction molaire [cm⁻¹.M⁻¹] et par la longueur du trajet optique [cm]. Pour rappel, les coefficients d'extinctions molaires de la pyoverdine et de la ferripyoverdine de BTP1 à pH 7 sont de 25.700 et 31.400 cm⁻¹.M⁻¹. La longueur du trajet optique est considérée comme égale à 1cm.

La concentration massique est ensuite obtenue par multiplication de la concentration molaire par la masse molaire de la pyoverdine ou de la ferripyoverdine (1077 et 1130).

2.3. Détermination du poids des cellules de la souche BTP1

La détermination du poids de cellule de BTP1 permet de relier la valeur de densité optique obtenue à 600 nm avec la concentration massique des cellules. Le but de la manipulation est de trouver le facteur de conversion à utiliser entre la DO à 600 nm et la concentration massique.

Sept fioles de 250 ml sont utilisées dans cette manipulation. Dans chacune, une culture est réalisée par inoculation de 100 ml de milieu CA à une DO de 0,05. Les 7 fioles sont analysées après différents temps : une après 4 et 5 h, deux après 6 et 7 h et une après 8 h de culture.

Ensuite, la DO à 600 nm de chaque culture est mesurée au spectrophotomètre. Ensuite, 25 ml de culture sont prélevés et filtrés sous vide sur des filtres 0,2 µm. Cette manipulation est réalisée en triplicat. Les filtres sont disposés au préalable dans l'étuve à 105°C pendant au minimum 1h puis laissés dans un dessiccateur et tarés. Après filtration, les filtres sont remis à l'étuve durant 24 h et pesés.

Le poids du filtre séché avec les cellules est soustrait au poids initial du filtre afin de connaître le poids de l'ensemble des cellules de BTP1 contenu dans 25 ml de solution pour chaque fiole et donc la concentration massique en g.l⁻¹. En remplaçant les différents points obtenus de la concentration massique en g.l⁻¹ en fonction de la DO initialement mesurée, une droite de régression peut alors être tracée. La pente de cette droite représente le facteur de conversion entre la DO et la concentration massique en cellule.

Il est à noter que les filtres utilisés afin de filtrer la première fiole de 5 h de culture n'ont pas été étuvés une heure au préalable en raison d'une erreur de manipulation.

2.4. Analyse par UPLC-MS

Les analyses de production de pyoverdine sont réalisées par UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography en anglais) couplé à un spectrophotomètre de masse (UPLC-MS). Le système UPLC-MS utilisé est un Acquity UPLC® H-Class et un détecteur SQ de la marque Waters. La colonne est une colonne chromatographique Acquity UPLC C18 BEH, avec des particules sphériques de 1,7 µm. Les dimensions de la colonne sont de 2,1 x 50 (diamètre intérieur x longueur) mm (Waters). Le logiciel utilisé afin d'analyser les résultats et les spectres est MassLynx.

Les analyses par UPLC-MS sont réalisées uniquement afin d'identifier la présence de pyoverdine. La méthode utilisée est une méthode spécifique, conçue pour analyser la pyoverdine.

Le solvant A est constitué d'eau (UPLC grade, BIOSOLVE) avec 0,1% d'acide formique (UPLC grade, Sigma-Aldrich). Le solvant B est formé d'acétonitrile (Chem Lab) avec 0,1% d'acide formique. Le volume injecté est de 10 µl avec un flux de la phase mobile de 0,6 ml/min. Le protocole d'élution utilisé par la méthode pyoverdine est le suivant (tableau 2) :

Tableau 2. Protocole d'élution de la méthode d'analyse des pyoverdines à l'UPLC-MS

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	98	2
0 - 5	98 - 55	2 - 45
5 - 5,5	55 - 5	45 - 95
5,5 - 6,7	5	95
6,7 - 7	5 - 98	95 - 2
7 - 9	98	2

Au niveau du spectrophotomètre de masse, l'ionisation par électronébuliseur est réalisée dans le mode d'ionisation positive. Le voltage du cône est de 120 V et le voltage capillaire de 2 kV. La température de la source est de 130°C et de désolvation est de 400°C. Les flux de gaz du cône et de désolvation sont fixés respectivement à 50l N₂.h⁻¹ et 1000l N₂.h⁻¹. La gamme de détection est de 900 à 1800 m/z). L'ionisation des molécules est réalisée par électrospray (ESI) en mode positif (ESI⁺). L'analyse est réalisée selon le mode « Multiple Reaction Monitoring (MRM) ».

2.5. Production de solution de surnageant sans sidérophore

La pyoverdine est produite par les *Pseudomonas* fluorescents en même temps que d'autres métabolites ou composés comme l'indoleacetate, l'HCN, la pyoluteorine et le 2,4-diacetylphloroglucinoles ou encore des acides organiques (Budzikiewicz, 1993; Robin et al., 2008). Ces autres composés peuvent également influencer la dissolution de la goethite ainsi que la solubilisation du phosphore.

Afin d'étudier exclusivement l'effet de la pyoverdine de BTP1, deux solutions de composition la plus semblable possible excepté la concentration en pyoverdine sont utilisées. Une solution contenant une grande concentration en pyoverdine et une autre contenant la plus faible concentration possible en pyoverdine sont produites.

Afin d'obtenir ces deux solutions, deux options sont identifiées. La première est l'utilisation de mutants de BTP1 présentant une biosynthèse de pyoverdine réduite. La deuxième est l'induction de la répression de la production de pyoverdine par la souche BTP1 grâce à l'ajout de fer au milieu de culture.

2.5.1. Mutants de la souche BTP1

Différents mutants de BTP1 obtenus par mutagenèse chimique sont retrouvés dans la collection du MiPI. Les différents mutants sont M1, M3, M6 et M17. Les mutants sont également mis en culture dans 10 ml de milieu CA et incubés durant 48h à 30°C sous agitation orbitale de 150 rpm. Les cultures sont également transvasées dans des falcons de 15 ml puis centrifugées 10 min à 4000 rpm. Les surnageants des mutants et de la souche sauvage de BTP1 du milieu KB et CA ainsi que les différentes fractions récupérées par élution de la colonne C18 sont analysés par UPLC-MS avec la méthode pyoverdine.

2.5.2. Inhibition de la production de pyoverdine

L'augmentation de la concentration en fer dans le milieu permet une meilleure croissance des cellules ainsi qu'une diminution de la production de sidérophores. En effet, la production de sidérophores est réprimée à partir d'une certaine concentration en fer dans le milieu.

Une solution de Fe(NO₃)₃.9H₂O de 0,4 M est préparée avec de l'eau ultra pure. Cette solution est stérilisée à 121°C pendant 20 min.

Les concentrations en Fe³⁺ suivantes sont testées dans 10 ml de KB et de CA: 31, 21 et 10,5 mg/l. Le pH des milieux est mesuré avant et après l'ajout de fer.

Afin de s'approcher de la concentration limite en fer, des essais sont réalisés sur la production de pyoverdine de la souche BTP1. Quatre milieux CA avec des concentrations de 0, 2, 3 et 4 mg/l de Fe^{3+} sont préparés. Ensuite, quatre cultures en fioles sont incubées pendant 24h à 30°C sous une agitation orbitale de 150 rpm. Trois échantillons de 1,5 ml de chaque fiole sont prélevés centrifugés à 10.000 rpm durant 5 min afin de récupérer le surnageant. La DO de chaque surnageant est mesurée par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400 nm.

2.6. Expérience cinétique en fioles

Une expérience cinétique en fioles de 12h est réalisée avec les milieux KB et CA de base (sans fer) et les milieux KB et CA avec ajout de 10,5 mg.l⁻¹ de Fe^{3+} (avec fer). Le but de cette manipulation est de comparer la croissance des cellules de BTP1 et la production de pyoverdine entre les milieux KB et CA mais également entre les milieux avec et sans fer.

Des cultures de 30 ml sont réalisées pour les quatre milieux dans des fioles de 100 ml. Chaque culture est réalisée en triplicat. Les douze fioles sont placées dans un incubateur à 30 °C sous une agitation orbitale de 150 rpm. Toutes les heures, un échantillon de chaque fiole est récolté. La DO à 600 nm est mesurée afin de suivre la croissance des cellules de BTP1 dans chaque milieu. Toutes les deux heures, un échantillon composite de chaque milieu est créé en mélangeant 1 ml et le pH est mesurée. À la fin de l'expérience, les eppendorfs sont centrifugées à 10.000 rpm durant 10 min. Les surnageants sont récupérés et passés à l'UPLC-MS.

2.7. Expérience cinétique en bioréacteur

Trois expériences cinétiques en bioréacteur ont été réalisées. Les bioréacteurs utilisés sont des DASGIP Parallel Bioreactor Systems de la marque Eppendorf. Quatre bioréacteurs de 250 ml sont utilisés en parallèle lors de chaque expérience.

Les bioréacteurs sont lavés à avec une solution d'eau ultra pure et d'EDTA 0,01 M avant utilisation. Ils sont ensuite rincés trois fois à l'eau ultra pure puis stérilisés. Les cultures sont réalisées dans un volume de 200 ml pour la première expérience et de 150 ml pour les deux autres. La température des cultures est maintenue à 30°C et le pH à 7 grâce à l'ajout de solution de NaOH et de H_3PO_4 3N stérile. Les bioréacteurs sont inoculés à une DO de 0,05 avec une préculture de BTP1 de 20 h. Aucun agent anti-moussant n'est ajouté lors des cultures.

2.7.1. Test de différents milieux

Quatre milieux de culture sont testés dans les 4 bioréacteurs à savoir le milieu CA et Succ de base (sans fer) et avec ajout de 10,5 mg.l⁻¹ de Fe^{3+} (avec fer). L'aération est fixée à 1 VVM (volume d'air par volume de bioréacteur par minute) et l'agitation à 400 rpm (Ongena, 1996).

Chaque heure durant les neuf premières heures, 2,5 ml sont prélevés de chaque bioréacteur et mis dans des eppendorfs de 2,5 ml. La DO est directement mesurée à 600 nm. Ensuite, les eppendorfs sont centrifugées à 10.000 rpm durant 10 min et la DO des surnageants est mesuré à 400 nm afin de doser la pyoverdine produite. La culture est arrêtée après 24h.

2.7.2. Test de différentes conditions d'agitation et d'aération.

Deux milieux de culture sont testés à savoir le milieu CA sans fer et avec fer ($10,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$) ainsi que deux conditions d'agitation, 600 et 700 rpm.

L'aération est fixée à 2 VVM afin de tester l'impact d'une plus grande aération sur la croissance et la production de pyoverdine.

Les mêmes manipulations et mesures que la première expérience sont réalisées pendant les neuf premières heures et à 24h. Après 24h, la culture est arrêtée et 100 ml de chaque bioréacteur sont récupérés. Les 4 x 100 ml sont centrifugés dans des falcons de 50 ml à 5.000 rpm durant 20 min. Les surnageants récupérés sont conservés à -20°C .

2.7.3. Essai de production de pyoverdine

Les deux milieux de culture utilisés sont le CA avec et sans fer comme lors de la deuxième expérience. L'aération est fixée à 2 VVM et l'agitation à 700 rpm. Après 10 h, la culture est arrêtée et 100 ml de chaque bioréacteur sont récoltés et centrifugés dans des falcons de 50 ml à 5.000 rpm durant 20 min. Les surnageants sont ensuite conservés à -20°C .

2.8. Production finale de pyoverdine

La production finale de pyoverdine est réalisée en fioles de 2 l. Les quatre fioles utilisées sont préalablement rincées trois fois à l'eau ultra pure puis stérilisées.

Deux cultures de 800 ml de milieu CA sans fer et deux avec l'ajout de 3 mg.l^{-1} de Fe^{3+} sont réalisées. L'ensemble des cultures est inoculé à une DO de 0,05 avec une préculture de la souche de BTP1 de 20 h.

Après 20 h de culture, le contenu des quatre fioles est transvasé dans des pots stériles et centrifugé à 10.000 rpm durant 10 min. Les quatre surnageants sont récupérés dans des Schott en verre de 1 L et conservés à -4°C durant 24 h avant utilisation.

2.9. Détermination de la force ionique des milieux

La même force ionique doit être présente dans les différentes solutions utilisées dans l'expérience afin de ne pas influencer la dissolution de la goethite et la co-solubilisation du phosphore. En effet, la force ionique de la solution influence la solubilité des oxydes de fer (Robin et al., 2008). Une force ionique est présente au niveau du milieu de culture CA. En effet, $0,25 \text{ g.l}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ est présent dans la recette du milieu. Cette concentration correspond à $24,6 \text{ mg Mg.l}^{-1}$ de milieu.

La concentration en magnésium des surnageants récupérés des quatre bioréacteurs de la troisième expérience et du milieu CA initial est mesurée par le spectromètre d'absorption atomique SpectrAA 220. Pour ce faire, les solutions sont diluées 200 x en mettant 125 μl de chaque solution dans une fiole de 25 ml. Un volume de 5 ml de $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 10.000 ppm est ajouté. Les fioles sont ensuite portées au trait avec de l'eau distillée et agitées avant la mesure.

Des concentrations de 0, 0,17 g.l^{-1} , 0,21 g.l^{-1} et de 0,25 g.l^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sont ajoutés à de l'eau ultra pure. Une quantité de 40 mg de goethite est ajoutée à 100 ml de chaque solution d'eau ultra

pure ayant des forces ioniques différentes dans des fioles de 250 ml. Après 24 h, le contenu des fioles est filtré sous vide sur filtre de 0,2 µm. Les différentes solutions obtenues sont dosées en fer par l'ICP-OES.

3. Dissolution de la goethite et de co-solubilisation du phosphore

3.1. Test de dissolution de la goethite

Les surnageants de culture récupérés lors de la deuxième culture en bioréacteur sous les conditions d'agitation de 700 rpm sont utilisés. Le premier surnageant provient de la culture en milieu CA sans fer et contient 34,8 mg.l⁻¹ de pyoverdine. Le deuxième surnageant est celui de la culture en milieu CA avec l'ajout de fer de l'ordre de 10,5 mg.l⁻¹. La concentration en pyoverdine de ce surnageant est de 3,24 mg.l⁻¹. Afin de clarifier la suite de ce travail, le premier surnageant sera appelé « pyoverdine » alors que le deuxième conservera l'appellation de « surnageant ». Une solution d'eau ultra pure est également utilisée en guise de blanc.

Les fioles sont préalablement rincées trois fois à l'eau ultra pure et stérilisées. Dans chacune, 50 mg de la première goethite (pH 6 ou 8) sont mis en contact avec 20 ml de solution (pyoverdine, surnageant ou eau ultra pure) pour une durée de contact de 7 ou de 24 h. L'ensemble des modalités est croisé excepté pour la solution d'eau ultra pure. En effet, en raison d'un manque de goethite, la goethite est mise en contact avec l'eau pendant 7 h uniquement. Les fioles sont mises sous agitation orbitale à 150 rpm.

Le contenu des fioles est ensuite filtré sous vide et à 0,2 µm afin d'enlever l'ensemble des particules de goethite. Le fer des solutions a été dosé par le spectromètre d'absorption atomique SpectrAA 220. Les solutions de pyoverdine, surnageant et eau utilisée ont une concentration initiale en fer. Cependant, seule la concentration en fer solubilisé à partir de la goethite par l'action des solutions doit être prise en compte. Ainsi, la concentration initiale de la solution utilisée est soustraite à la concentration mesurée à la fin de l'expérience, après mise en contact avec la goethite durant 7 ou 12 h.

3.2. Expérience finale de dissolution de la goethite et de co-solubilisation du phosphore

Le but de la dernière expérience est d'étudier l'effet des pyoverdines sur la dissolution de la goethite ainsi que sur la co-solubilisation du phosphore adsorbé à sa surface. De plus, l'action des pyoverdines est comparée à d'autres agents chélatants à savoir l'oxalate et l'ascorbate. Un blanc constitué d'eau ultra pure sera également utilisé.

Plusieurs facteurs entrent en jeu dans cette expérience.

Il y a deux types de goethite, à savoir la goethite pure et la goethite sorbée.

Deux pH sont également testés à savoir pH 6 et 8. Le pH représente le pH de la solution mise en contact avec la goethite, mais également le pH de la solution de KH₂PO₄ lors de l'adsorption des

ions phosphates sur la goethite. Le pH des différentes solutions est ajusté avec de l'HCl et du NaOH 0,1 M.

Ensuite, cinq solutions sont mises en contact avec la goethite. Les deux premières sont les solutions de surnageants obtenues lors de la production finale en fiole de 2 L. Les solutions de pyoverdine et de surnageant ont des concentrations en pyoverdine respectives de $3,8 \times 10^{-5}$ M et $1,03 \times 10^{-6}$ M. Une solution d'oxalate 3×10^{-3} M et une solution d'ascorbate 2×10^{-3} M sont également préparées. La dernière solution ne contient pas d'agents chélatants et est composée d'eau ultra pure. L'ensemble des solutions possède une force ionique de $8,1 \times 10^{-4}$ M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ainsi qu'une concentration en tampon MOPS de 5×10^{-3} M. L'ensemble des solutions est réalisé avec de l'eau ultra pure.

Enfin, différentes durées de contact entre la goethite et les solutions sont appliquées à savoir de 8, 12 et 24 h.

L'ensemble des facteurs est croisé afin d'obtenir 60 modalités différentes. De plus, chaque modalité est réalisée en triplicat afin de donner 180 échantillons différents.

Pour chaque échantillon, 42 mg de goethite sont pesés et transvasés quantitativement dans une fiole de 250 ml à l'aide de 100 ml de solution. Les fioles sont mises sous agitation orbitale de 150 rpm durant 8, 12 ou 24 h. Ensuite, les fioles sont filtrées sous vide sur du $0,2 \mu\text{m}$ et les filtrats sont conservés à -20°C .

L'ensemble des 180 échantillons ainsi que les 10 solutions initiales (5 solutions différentes avec 2 pH) sont analysés à l'ICP-OES. Le fer ainsi que le phosphore sont dosés respectivement à 259,94 et 213,618 nm. Les résultats obtenus sont en mg Fe L^{-1} de solution ou en mg P.L^{-1} de solution. Après transformation des données, elles sont exprimées en millimoles de fer ou phosphore soluble relargué par kilogrammes de goethite mis en solution (mmol Fe.P kg^{-1}). De plus, les concentrations en fer et phosphore des solutions initiales sont soustraites aux concentrations des échantillons. Cette étape permet de ne tenir compte que de la concentration en fer et phosphore solubilisé de la goethite par l'action des solutions.

3.3. Analyses statistiques

Le logiciel utilisé afin de réaliser les analyses statistiques des résultats est Minitab® 17. Les conditions d'application sont vérifiées par un test de Ryan et Joiner pour la normalité des populations et par un de Levene pour l'égalité des variances des populations. Des analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs (type de goethite, solutions et pH) et à un facteur (solutions ou combinaison des trois facteurs précédent) ont été réalisées sur les données. La limite de significativité est fixé à $\alpha=0,05$. En présence d'une différence significative, un test de Tukey est appliqué afin de classer les différentes modalités du facteur étudié.

V. Résultats et discussion

1. Production, caractérisation et préparation de la goethite

1.1. Production de goethite

1.1.1. Production selon le premier protocole

L'expérience de production de la première goethite est effectuée à deux reprises. La première expérience est réalisée à partir d'une quantité initiale de 24,2 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ et la deuxième de 40,4 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. À la fin des deux expériences, une quantité de goethite de 4,74 g et 9,17 g sont obtenues respectivement pour la première et la deuxième expérience. En considérant que l'ensemble de la poudre obtenue est de la goethite, des rendements en fer de 89,22% et 103,23% sont obtenus. Le rendement plus faible de la première expérience est dû à une perte lors du versement de la solution de goethite dans les sachets de dialyse.

Ces rendements sont très élevés et dépassent 100% pour la deuxième expérience. Ces valeurs peuvent avoir été surestimées par des imprécisions au niveau de la quantité de fer initiale mise en solution et au niveau la quantité de fer finale de la goethite dosée par l'ICP-OES. De plus, la poudre obtenue n'est pas constituée uniquement de goethite pure. De la ferrihydrite, précurseur de la goethite peut être présente et possède une masse moléculaire plus élevée que la goethite. En effet, la poudre obtenue est orange foncé (figure 12) alors que la goethite est jaune-brun et la ferrihydrite rouge-brun (Schwertmann, 1996). D'autres éléments sont également présents comme des ions nitrates et phosphates ou des cations potassium provenant des différentes solutions mises en contact avec la goethite durant sa production.



Figure 12. Poudre de goethite obtenue par le premier protocole de production

1.1.2. Production selon le deuxième protocole

La manipulation de production de la deuxième goethite a été effectuée à six reprises à partir d'une quantité de 50 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Des quantités respectives de poudre de goethite de 11, 12, 12, 10, 10 et 11 g sont obtenues pour les six expériences. Les rendements obtenus sont donc compris entre 91 et 109%. Villacís García et al., 2015, obtiennent des valeurs comprises entre 8 et 9 g, correspondant à des rendements en fer situés entre 72 et 82%. Les mêmes hypothèses que lors de la première méthode de production peuvent expliquer ces valeurs plus élevées. Cependant, la poudre de goethite obtenue est d'une couleur jaune ocre, montrant une plus grande proportion de goethite que lors de la première méthode de production (figure 13).



Figure 13. Poudre de goethite obtenue par la deuxième méthode de production

1.2. Caractérisation de la goethite

1.2.1. Point de charge nulle

Le point de charge nulle de la première goethite est de 7,01. La courbe représentant la différence de pH entre le pH final après 48 h de contact avec la goethite et le pH initial (ΔpH) en fonction du pH initial (pH_i) est représentée à la figure 14.

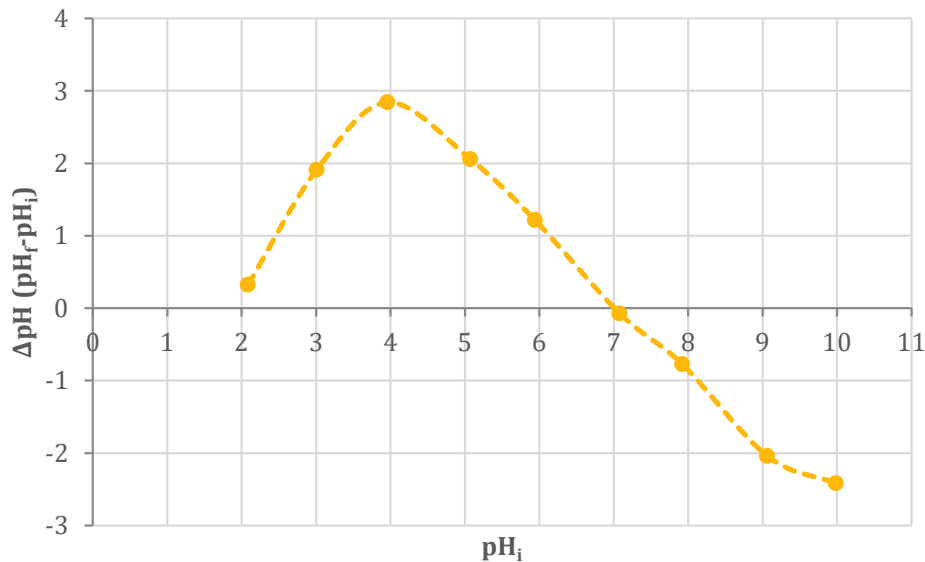


Figure 14. Courbe du point de charge nulle de la première goethite. La courbe représente la différence de pH entre le pH final après 48 h de contact avec la goethite et le pH initial (ΔpH) en fonction du pH initial (pH_i)

Le point de charge nulle de la goethite est, en moyenne de $8,32 \pm 0,89$ alors que celui d'autres hydroxydes de fer comme la ferrihydrite se situe, en moyenne à $7,27 \pm 0,77$ (Kosmulski & Maczka, 2003). Le point de charge nulle de la première goethite se rapproche donc plus du point de charge nulle de la ferrihydrite que de la goethite. En plus de la couleur de la poudre, l'analyse du point de charge nulle permet donc d'appuyer l'hypothèse que la poudre produite est un mélange de ferrihydrite et de goethite.

Cependant, même en considérant un mélange d'oxydes de fer, le point de charge nulle mesuré est plus faible que les moyennes retenues. En effet, l'adsorption d'anions à la surface des oxydes de fer entraîne une diminution du point de charge nulle vers de plus faibles pH (Kosmulski, Saneluta,

et al., 2003). Des anions nitrates ont pu être adsorbés à la surface de la goethite. En effet, lors de l'étape de dialyse, le pH de la solution de goethite est amené à environ 6,3, situé en dessous du point de charge nulle moyen de la goethite et de la ferrihydrite. Dans ces conditions, la goethite est chargée positivement.

La mesure du point de charge nulle de la deuxième goethite est réalisée en triplicat. Le point de charge nulle moyen obtenu est de $8,15 \pm 0,04$. Les trois courbes représentant la différence de pH entre le pH final après un contact de 48 h avec la goethite et le pH initial (ΔpH) en fonction du pH initial (pH_i) pour les trois réplicats sont illustrées à la figure 15.

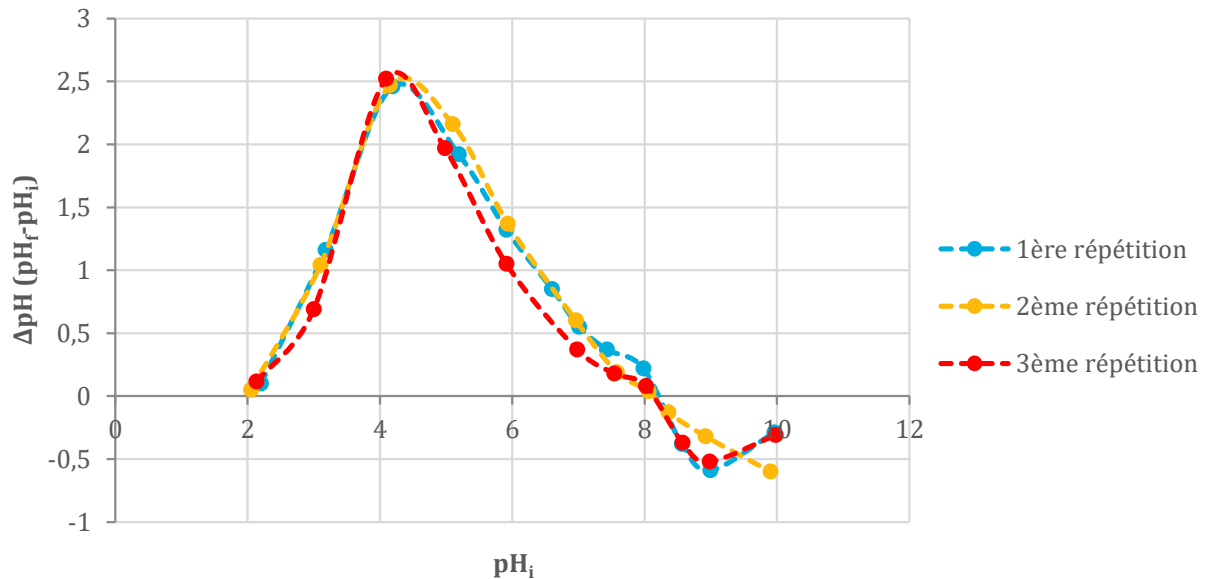


Figure 15. Courbes du point de charge nulle de la deuxième goethite. Les courbes représentent la différence de pH entre le pH final après 48 h de contact avec la goethite et le pH initial (ΔpH) en fonction du pH initial (pH_i) pour les trois répétitions.

Le point de charge nulle de la deuxième goethite se rapproche de la moyenne pour la goethite donnée par Kosmulski & Maczka, 2003. Cette observation et la couleur plus jaune de la poudre permettent d'émettre la supposition que la poudre de la deuxième goethite est plus pure que la première. La valeur du point de charge obtenue peut également avoir été sous-estimée par l'adsorption d'anions à sa surface.

1.2.2. Morphologie

Les figures 16, 17 et 18 représentent les images MEBE de la deuxième goethite à des résolutions de $10 \mu\text{m}$ à 300nm . À partir de ces images, la forme ainsi que la taille moyenne des cristaux de goethite sont observées.

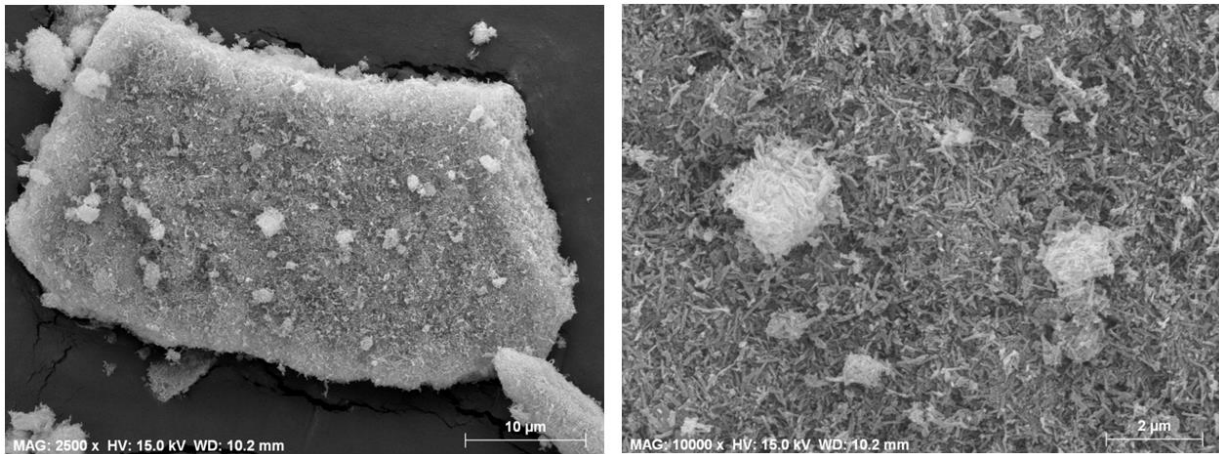


Figure 16. Images MEBE de la deuxième goethite à 10 et 2 μm

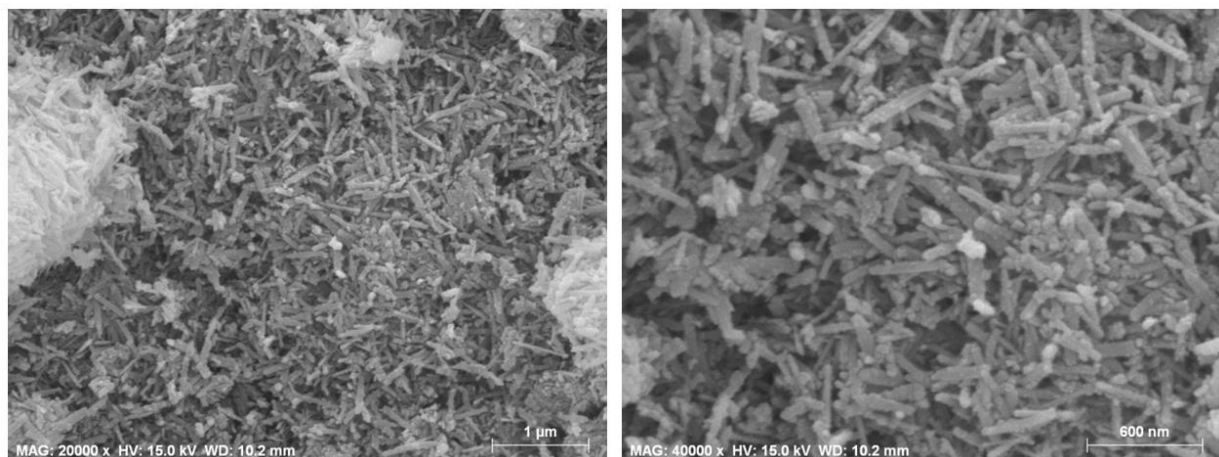


Figure 17. Images MEBE de la deuxième goethite à 1 μm et 600 nm

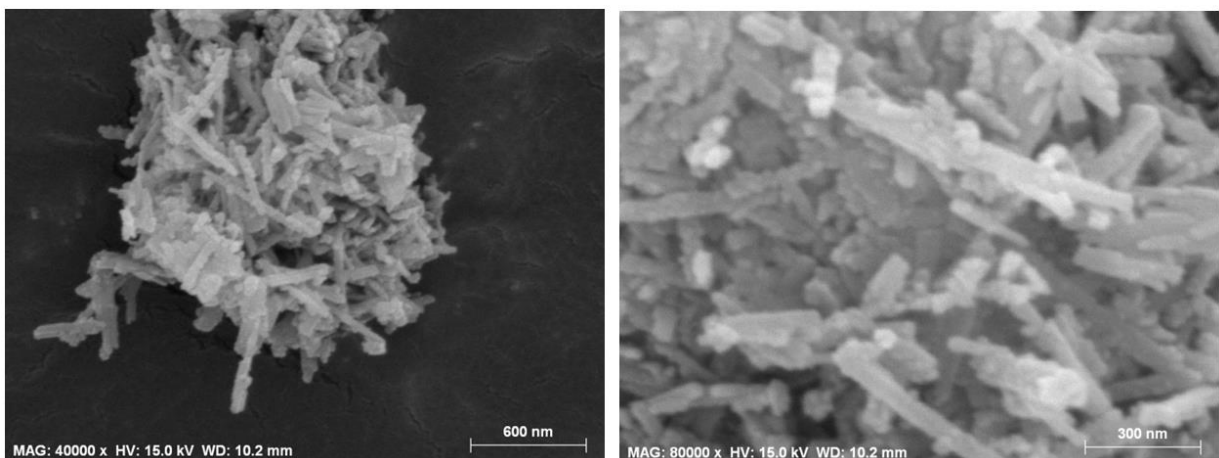


Figure 18. Images MEBE de la deuxième goethite à 600 et 300 nm

La forme typique en lattes ou en bâtonnets des cristaux de goethite est retrouvée (Schwertmann, 1996; Kosmulski et al., 2004; Villacís-García et al., 2015). En effet, les cristaux de goethite se retrouvent sous la forme de prismes à trois faces. La longueur (axe 001) est la plus grande face suivie par la largeur (axe 010) et la hauteur (axe 100). Cependant, la longueur et la largeur

seulement peuvent être directement tirées des images MEBE, car les cristaux de goethite forment des agrégats.

La taille des cristaux de goethite produits est de 250 à 500 nm de longueur et de 30 à 80 nm de largeur. Ces tailles correspondent à celles retrouvées dans la littérature. En effet, Kosmulski et al., 2004 ont répertorié les dimensions de nombreuses goethites synthétiques trouvées dans la littérature. La longueur des cristaux de goethite est comprise entre 50 nm et 1 µm pour les plus longues. La largeur peut aller de 15 à 60 nm (Kosmulski et al., 2004). En suivant le même protocole que celui appliqué pour la production de la deuxième goethite, Villacís García et al., 2015 ont obtenu une largeur d'environ 50 nm.

La figure 19 représente les cristaux de la première goethite obtenue par MEBE.

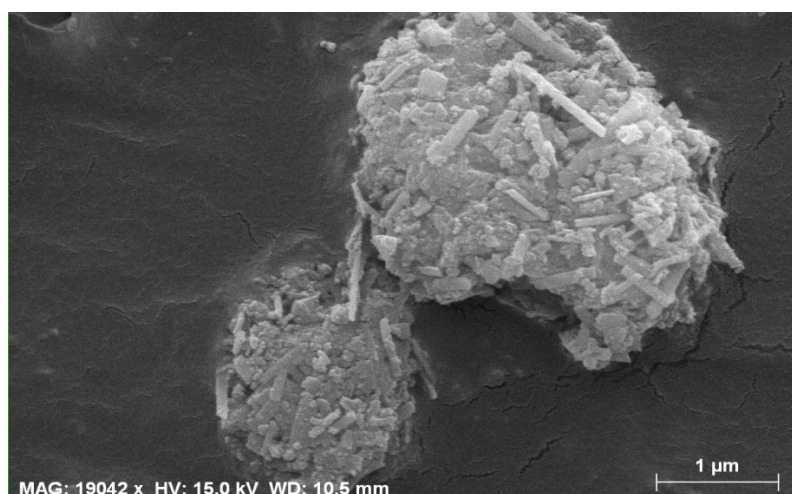


Figure 19. Image MEBE de la première goethite à 1 µm

Au niveau de la première goethite, les formes des cristaux retrouvés sont plus hétérogènes. En effet, certains cristaux ont également une forme de bâtonnets, associés à la goethite. D'autres particules de formes sphériques sont également présentes. Il s'agit de la forme caractéristique des cristaux de ferrihydrite (Schwertmann, 1996; Wang, et al., 2013; Villacís-García et al., 2015).

L'observation au MEBE des cristaux de la première et de la deuxième goethite confirme la plus grande homogénéité et pureté de la deuxième goethite. En raison de meilleures caractéristiques de la deuxième goethite (couleur, morphologie, homogénéité et point de charge nulle), cette dernière est utilisée dans la suite des expériences. La première goethite est quant à elle employée afin de réaliser des tests préalables aux expériences et de valider les protocoles.

1.2.3. Surface spécifique

La surface spécifique de la deuxième goethite, obtenue par la méthode BET, est de $93,4 \pm 0,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Lors de la formation de goethite, la vitesse d'addition de la base NaOH a une grande influence sur la taille des cristaux de goethite et ainsi sur la surface spécifique de la goethite. En effet, plus les particules de goethite sont petites, plus la surface spécifique sera grande (Montes-Hernandez et al., 2011). En utilisant le même protocole de formation de goethite, Villacís García et al., 2015 ont obtenu une surface spécifique de 64, 83 et de $101 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour des vitesses d'ajout de la base NaOH de respectivement 10, 5 et $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Dans ce travail, la base est ajoutée à une vitesse de 3,5

ml.min⁻¹. En considérant une relation linéaire entre la vitesse d'ajout de la base et la surface spécifique obtenue ($R^2=0.998$ et $y=-4,0984x+104,52$), la surface spécifique théorique de la goethite produite devrait être de 90,2 m².g⁻¹. La valeur de la surface spécifique obtenue est donc dans la bonne gamme de valeur.

1.3. Adsorption des ions phosphates

1.3.1. Mise au point du protocole sur la première goethite

Le but de l'expérience est de tester plusieurs concentrations en ions phosphates, pH et temps de contact entre la goethite et la solution de phosphates afin d'obtenir une adsorption la plus élevée possible. En effet, les réactions d'adsorption d'ions phosphates dépendent de la concentration en ions phosphates dans la solution, du pH, de la concentration en électrolyte, du temps de réaction et de la température (Barrow, 2015). Le graphique du phosphore adsorbé à la surface de la goethite en mmol P.kg⁻¹ goethite en fonction du temps de contact est représenté à la figure 20.

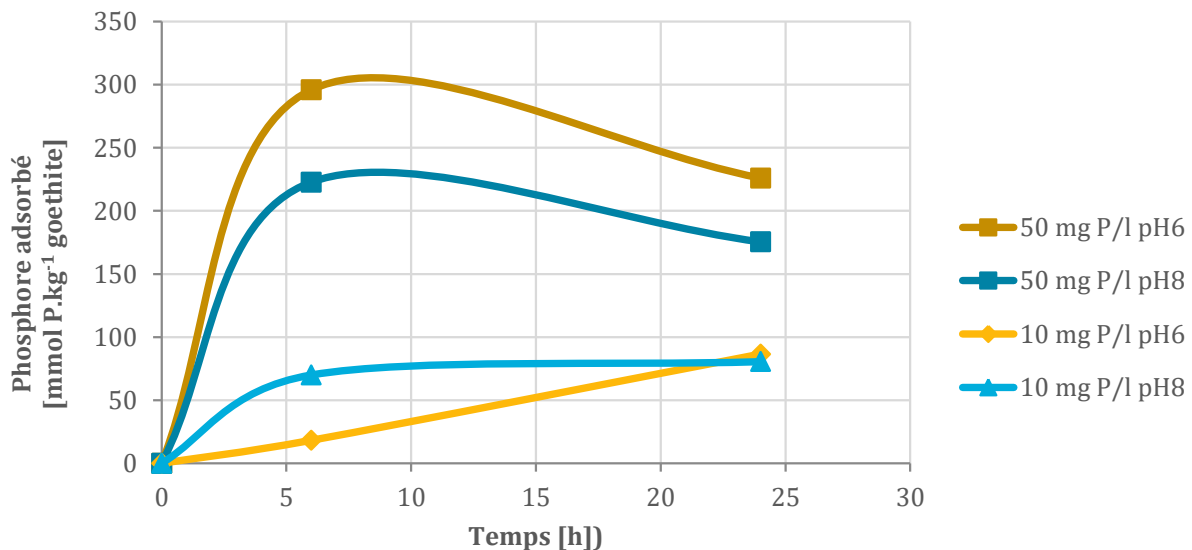


Figure 20. Phosphore adsorbé à la surface de la première goethite en fonction du temps de contact avec des solutions de concentrations en phosphore initial de 50 et 10 mg.l⁻¹ ainsi qu'à pH 6 et 8.

Une augmentation de la concentration en phosphore dans la solution initiale entraîne une augmentation de concentration d'ions phosphates adsorbés à la surface de la goethite jusqu'à atteindre un maximum d'adsorption (Braun et al., 2019). En effet, après 24 h de contact, les concentrations en phosphore adsorbé pour une concentration initiale de 50 mg.l⁻¹ sont de 226 et 175 mmol P.kg⁻¹ respectivement à pH 6 et 8. Pour une concentration initiale de 10 mg.l⁻¹, les concentrations en phosphore adsorbé chutent à 86,5 et 80,5 mmol P.kg⁻¹, respectivement à pH 6 et 8.

Le pH de la solution initiale de phosphore a également une influence. Après 24h, la concentration en phosphore adsorbé est plus élevée à pH 6 qu'à pH 8 pour la concentration en phosphore initiale de 50 mg.l⁻¹. En effet, l'adsorption des ions phosphates est plus élevée à faible pH et diminue avec l'augmentation du pH (Shang et al., 1992). Cette tendance est due aux interactions électrostatiques entre la surface de la goethite et les ions phosphates. Avec l'augmentation du pH,

la charge superficielle positive de la surface de la goethite devient de plus en plus faible ce qui entraîne une diminution de la capacité d'adsorption de la goethite. De plus, les ions phosphates se déprotonent et deviennent de plus en plus négatifs entraînant une répulsion (Braun et al., 2019). Au niveau de la solution à 10 mg.l^{-1} , les concentrations en phosphore adsorbé à la surface de la goethite à pH 6 et 8 sont semblables. Cependant, la courbe à pH 6 semble être en pleine augmentation alors que la courbe à pH 8 semble avoir atteint un plateau. Si une plus grande durée de contact avait été laissée entre la goethite et la solution de phosphore à 10 mg.l^{-1} , la concentration en phosphore adsorbée aurait pu également être plus importante à pH 6 qu'à pH 8.

Au niveau de la durée de contact entre les solutions de phosphore et la goethite, une augmentation de la concentration en phosphore adsorbé est observée durant les 24 h pour une concentration initiale de 10 mg P.l^{-1} . Cependant, dans le cas de la concentration initiale de 50 mg P.l^{-1} , la concentration en phosphore adsorbé augmente durant les 6 premières heures pour ensuite diminuer. La réaction d'adsorption des ions phosphates à la surface de la goethite se réalise en deux phases avec une première phase rapide et une deuxième plus lente (Torrent et al., 1992; Wang, et al., 2013; Braun et al., 2019). Les deux phases sont visibles sur l'ensemble des courbes excepté pour la concentration initiale de 10 mg P.l^{-1} à pH 6. En effet, la concentration en phosphore adsorbé augmente rapidement puis de plus en plus lentement jusqu'à atteindre un équilibre. Cependant, l'équilibre est vite atteint et la phase lente d'adsorption est réduite. En effet, la diffusion des ions phosphates au sein de la goethite ne se produit pas aisément en raison d'une grande cristallinité de la goethite synthétique (Barrow, 1985; Parfitt, 1989; Barrow, 2015). Une phase d'adsorption plus lente peut toutefois être observée en raison de sites défectueux ou de la présence d'une petite quantité de ferrihydrite restante. Les réactions des ions phosphates avec les oxydes de fer dépendent du nombre de groupes réactifs de surface présent et de la cristallinité des oxydes. Les réactions sont d'abord rapides avec un fort échange de ligands puis plus lentes avec un plus faible échange de ligands et la pénétration au sein de la matrice.

Les deux courbes à 50 mg P.l^{-1} présentent une légère diminution de la concentration en phosphore adsorbé après 6h. Cependant, seulement deux mesures ont été réalisées (6 et 24 h) et seulement en une répétition. Les résultats doivent donc être interprétés avec précaution, car la forme des courbes n'est pas précise.

1.3.2. Adsorption d'ions phosphates sur la deuxième goethite

Au niveau de l'adsorption des ions phosphates sur la deuxième goethite, une plus grande concentration de la solution initiale est choisie. En effet, une solution à une concentration de $2,7 \text{ g P.l}^{-1}$ est mise en contact avec la goethite afin de maximiser l'adsorption. Une plus grande durée de contact est également appliquée dans la même optique.

Une extraction, par attaque tri-acide, du phosphore adsorbé sur la goethite donne des adsorptions de 339 et $433,7 \text{ mmol P.kg}^{-1}$ de goethite, respectivement à pH 6 et 8. Il est à noter qu'une concentration initiale de $2,7 \text{ g P.l}^{-1}$ représente $1341 \text{ mmol P.kg}^{-1}$.

Une première constatation est la plus grande adsorption d'ions phosphates de la deuxième goethite par rapport à la première (339 contre $226 \text{ mmol P.kg}^{-1}$ à pH 6 et $432,6$ contre $175 \text{ mmol P.kg}^{-1}$ à pH 8). La concentration en ions phosphates adsorbés est plus élevée en raison d'un temps

de contact plus long et d'une concentration initiale en phosphore plus importante. De plus, le point de charge nulle de la deuxième goethite est plus élevé que la première. À pH 6 et 8, la surface de la deuxième goethite est plus fortement chargée positivement que la surface de la première. La deuxième goethite a donc une meilleure capacité d'adsorption des ions phosphates (Krumina et al., 2016).

Une deuxième constatation est que la goethite adsorbe une plus grande quantité d'ions phosphates à pH 8 qu'à pH 6. Or l'inverse était attendu. Cependant, la littérature relate certains cas où une augmentation du pH a également entraîné une augmentation de l'adsorption des ions phosphates. En effet, une augmentation du pH de la solution entraîne une plus faible solubilité des oxydes de fer et donc la présence d'une plus grande proportion de fer précipité sous la forme d'oxydes qu'à pH 6 (Amarasiri et al., 1973). De plus, lors du dosage des ions phosphates dans les solutions initiales à pH 6 et à pH 8, des concentrations de 2,98 et 3,77 g P.l⁻¹ ont été obtenues. Ces concentrations diffèrent des 2,7 g.l⁻¹ annoncés en raison d'imprécisions au niveau des manipulations. La concentration initiale en ions phosphates de la solution à pH 8 plus élevée que celle à pH 6 a pu entraîner une plus grande adsorption à la surface de la goethite à pH 8 qu'à pH 6.

1.4. Composition élémentaire

La composition élémentaire de la deuxième goethite uniquement est réalisée. La composition des trois goethites différentes à savoir la goethite pure et les goethites ayant subi une adsorption d'ions phosphates à pH 6 et à pH 8 est analysée.

Les résultats de la composition élémentaire sont repris dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Composition élémentaire en sodium, potassium, magnésium et calcium des trois types de deuxième goethite (pure et sorbée à pH 6 et pH 8)

Type de goethite	Type de données	Sodium [g Na.100 g ⁻¹]	Potassium [g K.100 g ⁻¹]	Magnésium [g Mg.100 g ⁻¹]	Calcium [g Ca.100 g ⁻¹]
Pure	Moyenne	0,491	0,019	0,001	0,009
	Écart-type	0,036	0,004	0,000	0,003
Sorbée pH6	Moyenne	0,198	0,996	0,001	0,005
	Écart-type	0,004	0,014	0,000	0,001
Sorbée pH8	Moyenne	0,730	1,435	0,001	0,004
	Écart-type	0,017	0,026	0,001	0,002

Tableau 4. Composition élémentaire en fer, aluminium, silicium et phosphore des trois types de deuxième goethite (pure et sorbée à pH 6 et pH 8)

Type de goethite	Type de données	Fer [g Fe.100 g ⁻¹]	Aluminium [g Al.100 g ⁻¹]	Silicium [g Si.100 g ⁻¹]	Phosphore [g P.100 g ⁻¹]
Pure	Moyenne	49,767	0,168	0,010	0,327
	Écart-type	1,922	0,027	0,005	0,051
Sorbée pH6	Moyenne	52,800	0,249	0,047	1,050
	Écart-type	1,311	0,013	0,020	0,044
Sorbée pH8	Moyenne	49,967	0,222	0,046	1,343
	Écart-type	1,498	0,005	0,035	0,050

La goethite pure produite est constituée de 49,77% fer. Le reste des éléments dosés, individuellement, ne dépassent pas les 0,5%. Une grande proportion de la goethite est également constituée d'oxygène et d'hydrogène, non dosés dans ce travail. Parfitt, 1989 avait obtenu un pourcentage de 50,7% en fer au niveau de goethite prélevé dans du basalte altéré à Auckland. Le sodium est la deuxième plus grande composante des éléments testés avec 0,49%. Le sodium présent dans la goethite provient plus que vraisemblablement de la précipitation de la ferrihydrite par ajout de NaOH.

Les goethites ayant subi une adsorption d'ions phosphates à pH 6 et à pH 8 sont constituées de 52,8 et 49,97% de fer ainsi que de 1,05 et 1,34% de phosphore. La goethite à pH8 contient une plus grande proportion de sodium qu'à pH6 en raison d'un plus grand ajout de NaOH au niveau de la solution de phosphore afin d'atteindre le pH8. Le potassium représente également une fraction non négligeable de ces deux types de goethite avec 1 et 1,4% respectivement à pH 6 et 8. En effet, la solution d'ions phosphates utilisée pour l'adsorption est une solution de KH₂PO₄ d'où la présence de cations potassium. Le plus grand pourcentage de potassium en pH 8 s'explique par une plus grande concentration en KH₂PO₄ dans la solution utilisée afin de réaliser l'adsorption d'ions phosphates sur la goethite à pH 8.

2. Production et caractérisation des solutions de pyoverdine

2.1. Production d'une solution de surnageant sans pyoverdine

2.1.1. Identification de la pyoverdine à l'UPLC-MS

L'ionisation des molécules est réalisée en ESI⁺. L'ionisation permet l'obtention d'ions chargés positivement soit par l'ajout d'un H⁺ ou d'un Na⁺ suivant la constitution de l'échantillon. Les différents fragments sont caractérisés par leur rapport m/z dans lequel m est la masse du fragment et z la charge. Dans l'ensemble des spectres de masse présenté, z=1, car les atomes d'ionisation sont d'un H⁺ ou d'un Na⁺.

La figure 21 représente le chromatogramme de l'éluion du surnageant de BTP1 dans le milieu CA. Sur celui, ci, les pics associés à la pyoverdine présentent un temps de rétention entre 2 et 2,5 minutes pour une analyse avec la méthode pyoverdine (voir point 2.4. de la section IV).

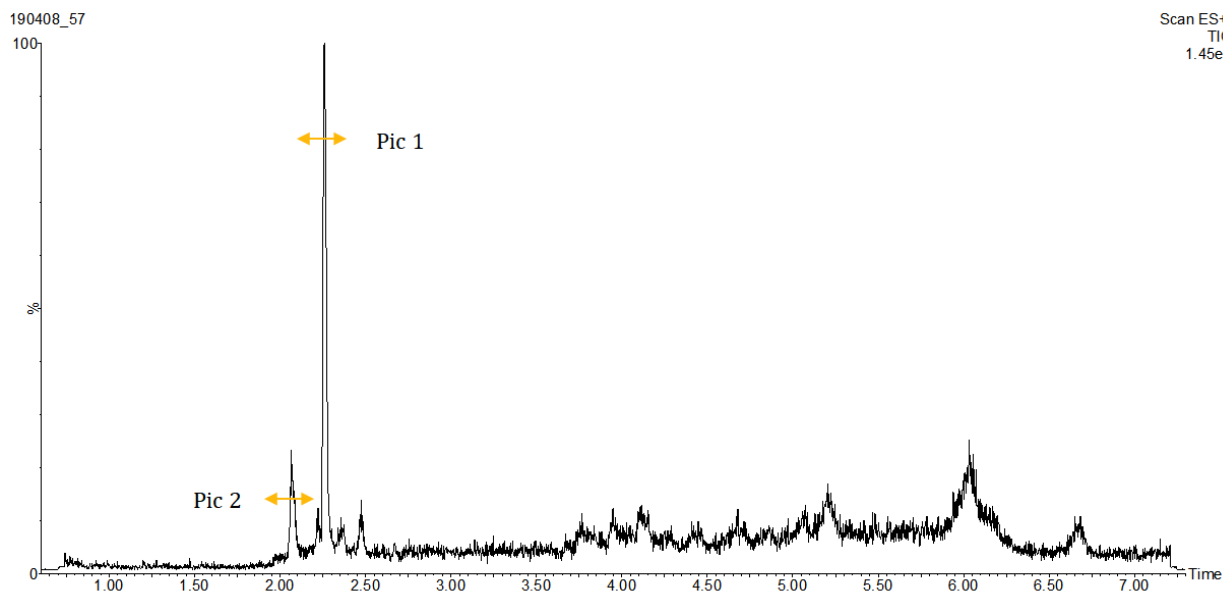


Figure 21. Chromatogramme de l'éluion du surnageant de BTP1 dans le milieu CA par l'UPLC-MS. Les pics d'éluion correspondant à la pyoverdine sont fléchés. L'axe des ordonnées représente le courant ionique total relatif (%). L'axe des abscisses représente le temps en minutes. Le courant ionique total (TIC) est de $1,45 \times 10^8$.

Les spectres de masse des deux principaux pics associés à la pyoverdine sont illustrés aux figures 22 et 23. Ces spectres sont donnés en exemple afin d'identifier le composé de la pyoverdine. Dans les expériences suivantes, les spectres de masse ne seront plus illustrés.

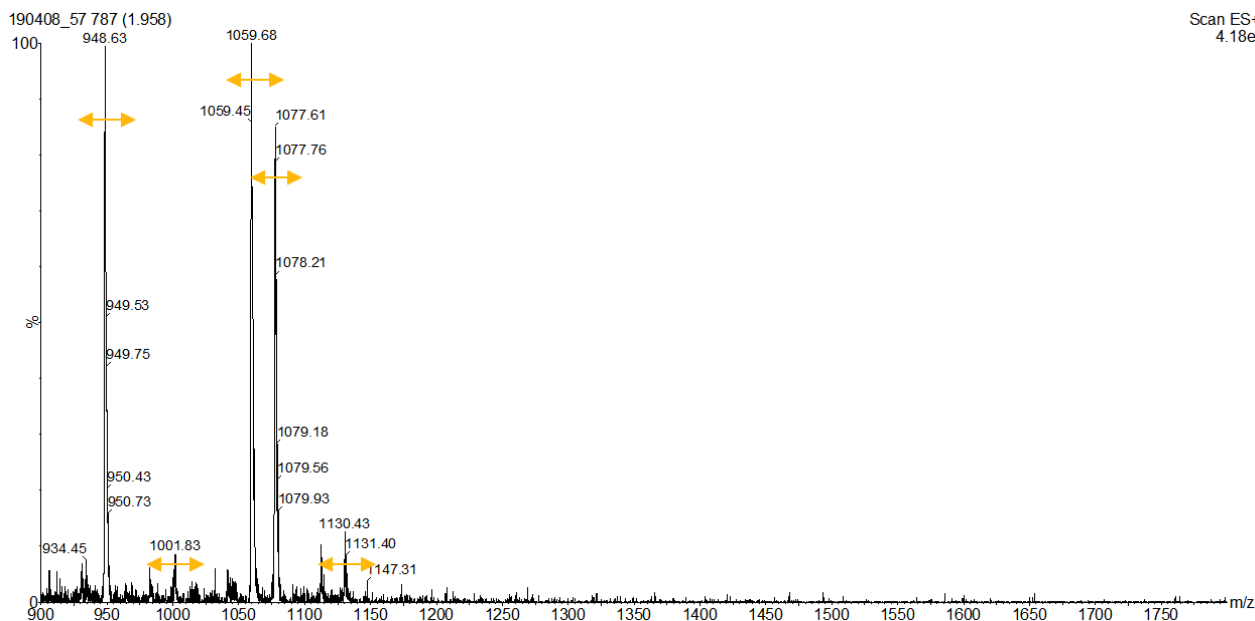


Figure 22. . Spectre de masse du pic n°1 du chromatogramme d'éluion correspondant à la pyoverdine produite par BTP1. Les pics correspondant aux fragments les plus importants à l'identification de la pyoverdine sont fléchés. L'axe des abscisses représente le rapport m/z et l'axe des ordonnées représente le courant ionique total relatif (%). Le TIC est de $4,18 \times 10^5$.

Au niveau de spectre de masse du premier pic d'éluion, cinq fragments sont importants dans l'identification de la pyoverdine. Le premier pic à 948,63 m/z correspond au fragment de la pyoverdine qui a perdu son acide glutamique (1077-129). Le deuxième pic à 1001,83 m/z provient de la ferripyoverdine qui a également perdu son acide glutamique (1130-129). Le fragment de pyoverdine ayant perdu une molécule d'eau est représenté par le pic à 1059 m/z. L'ion moléculaire de la pyoverdine [M+H]⁺ est retrouvé à un rapport m/z de 1077. Enfin, la ferripyoverdine est un fragment caractérisé par un rapport m/z de 1130.

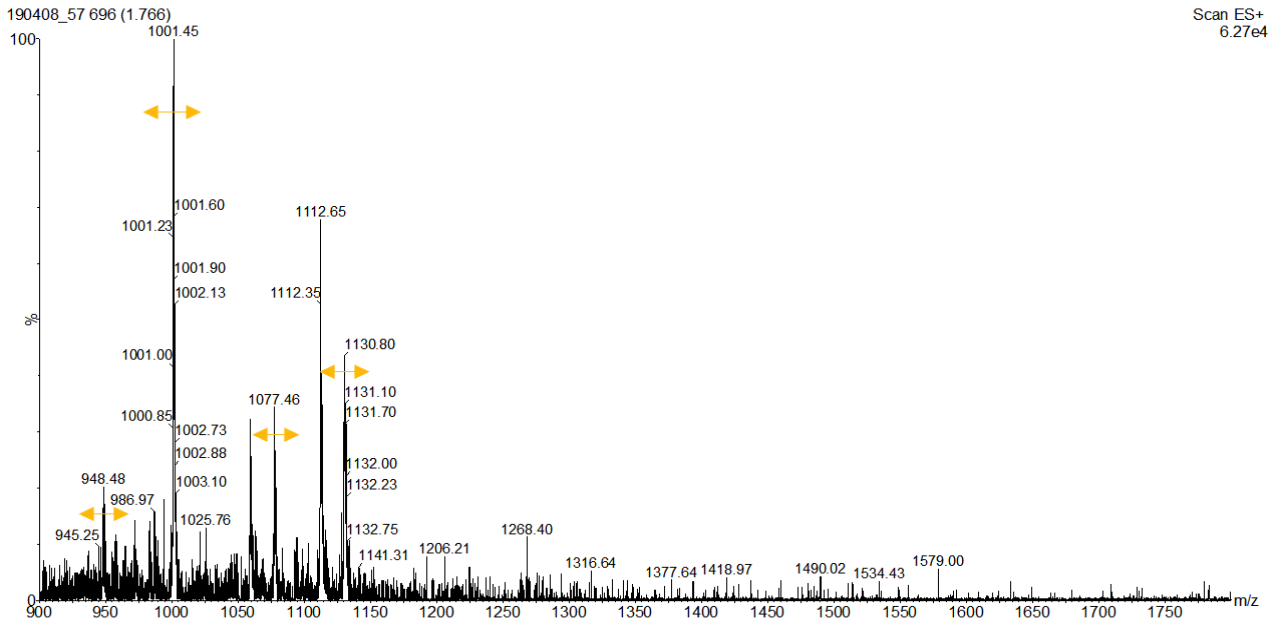


Figure 23. Spectre de masse du pic n°2 du chromatogramme d'éluion correspondant à la pyoverdine produite par BTP1. Les pics correspondant aux fragments les plus importants à l'identification de la pyoverdine sont fléchés. L'axe des abscisses représente le rapport m/z et l'axe des ordonnées représente le courant ionique total relatif (%). Le TIC est de $4,18 \times 10^5$.

Au niveau du deuxième pic d'éluion, les mêmes fragments principaux que dans le premier pic d'éluion, mais pas dans les mêmes proportions. Ainsi, les pics correspondants aux fragments de ferripyoverdine (avec ou sans perte d'un acide glutamique) à 1001 et 1130 m/z sont plus importants. Les fragments de pyoverdine (avec ou sans perte d'une molécule d'eau) à 948 et 1077 m/z sont visibles.

2.1.2. Mutants de la souche BTP1

Les différentes cultures de BTP1 et des mutants réalisées dans la Casamino Acid sont illustrées à la figure 24.

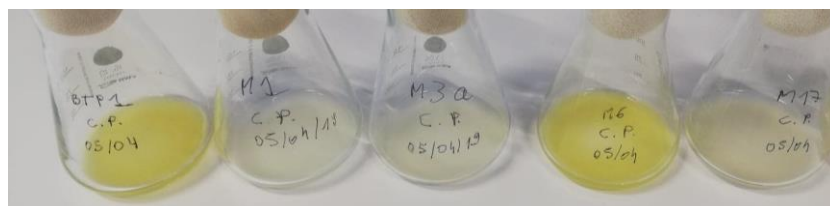


Figure 24. Culture de la souche sauvage BTP1 ainsi que de ses mutants M1, M3, M6 et M17 dans du milieu Casamino Acid durant 48 h à 30°C.

L'observation de la couleur de ces cultures permet d'émettre l'hypothèse que la souche BTP1 et M6 produisent des pyoverdines alors que les souches M1, M3 et M17 n'en produisent pas. Cependant, l'absence de couleur jaune-vert au niveau de la culture ne permet pas d'affirmer l'absence de pyoverdine. Afin de confirmer l'hypothèse, les résultats des échantillons passés à l'UPLC-MS sont analysés.

La figure 25 montre les chromatogrammes obtenus par l'UPLC-MS lors de l'élution des surnageants de culture de BTP1, M1, M3, M6 et M17.

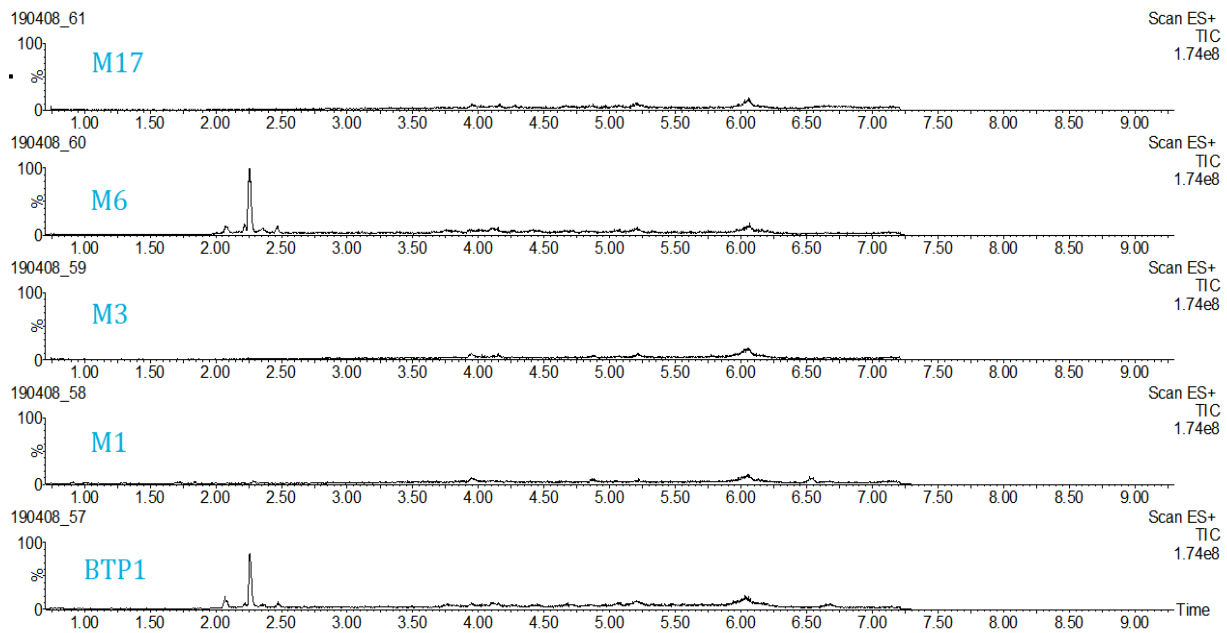


Figure 25. Chromatogrammes d'élutions obtenu par UPLC-MS des surnageants de culture de BTP1 et de ses mutants M1, M3, M6 et M17. L'abscisse représente le courant ionique total relatif (%). L'ordonnée représente le temps en minutes. Le TIC est de $1,7 \times 10^8$.

Les pics présents entre 1,7 et 2,2 minutes correspondent à la pyoverdine de BTP1. Ces résultats confirment l'hypothèse émise : la souche BTP1 et le mutant M6 produisent de la pyoverdine tandis que les mutants M1, M3 et M17 ne produisant pas de pyoverdine.

Cependant, ces mutants sont obtenus par mutagenèse chimique qui engendre des mutations aléatoires. D'autres modifications génétiques que la non-production de pyoverdine peuvent donc être présentes au niveau des souches mutantes. Ainsi, les surnageants de BTP1, M1, M3 ou M17 n'auront pas nécessairement la même composition, exceptée au niveau de la pyoverdine.

2.1.3. Inhibition de la production de pyoverdine

La pyoverdine est produite dans des conditions présentant un déficit en fer par les bactéries afin d'en acquérir. Cependant, dans les milieux présentant une concentration en fer assez élevée pour répondre aux besoins des bactéries, le système de synthèse des pyoverdines reste inactivé. La concentration en fer minimum permettant la répression de la synthèse de sidérophores est de 20 μM (Sayed et al., 2005). Dave et al. (2000) ont défini la limite à 27 μM en étudiant trois *Pseudomonas* différents. En considérant une limite de 30 μM , une concentration de 1,68 mg.l^{-1} Fe^{3+} est donc nécessaire dans le milieu afin de limiter la production de pyoverdine.

Pour l'ensemble des expériences préliminaires, une concentration en fer de 10,5 mg.l⁻¹ est ajoutée au milieu de culture lorsque l'absence de pyoverdine dans le surnageant est nécessaire. En effet, cette concentration en fer n'entraîne pas de précipitation au sein du milieu de culture et entraîne une faible diminution du pH comparée aux autres concentrations testées (31 et 21 mg.l⁻¹ de Fe³⁺).

Cependant, pour l'expérience finale de dissolution de la goethite et de solubilisation des ions phosphates, une faible concentration en fer des solutions chélatantes est nécessaire. Une concentration en fer trop importante pourrait avoir une influence non négligeable sur l'expérience et la précision du dosage.

Les cultures de 24 h de BTP1 dans le milieu CA contenant des concentrations de 0, 2, 3 et 4 mg.l⁻¹ de fer sont montrées à la figure 26.

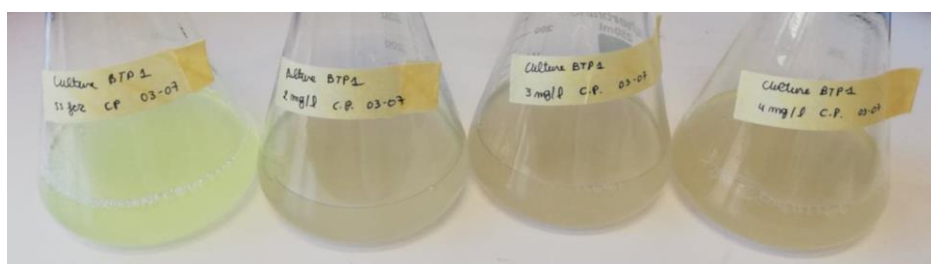


Figure 26. Cultures de BTP1 dans du milieu Casamino Acid possédant des concentrations en fer de 0, 2, 3 et 4 mg.l⁻¹ de fer durant 24 h à 30°C

La culture dans le milieu CA sans fer présente une couleur jaune-verte fluorescente typique des pyoverdines alors que les trois autres cultures ont une couleur terne. Cependant, la culture avec 2 mg.l⁻¹ de fer est plus claire qu'avec 3 ou 4 mg.l⁻¹ de fer pouvant produire d'une faible production de pyoverdine. Les concentrations massiques des quatre cultures sont présentées au tableau 5.

Tableau 5. Moyennes et écarts-types des concentrations massiques en pyoverdine [mg.l⁻¹] mesurées dans les surnageants de culture de la souche BTP1. Les milieux Casamino Acid utilisés possèdent une concentration en fer de 0, 2, 3 et 4 g.l⁻¹

Concentration en Fe ³⁺ [mg.l ⁻¹]	Concentration moyenne en pyoverdine [mg.l ⁻¹]	Écart-type [mg.l ⁻¹]
0	7,98	0,09
2	1,83	0,12
3	1,52	0,13
4	1,59	0,19

La concentration en pyoverdine de 7,98 mg.l⁻¹ est faible malgré l'absence de fer dans le milieu. Une erreur de manipulation ou des mauvaises conditions de cultures ont pu causer cette faible production de pyoverdine. Cependant, comme prédit, les cultures réalisées en présence de 2, 3 et 4 mg.l⁻¹ de fer présentent une très faible production de pyoverdine avec une valeur légèrement

plus élevée en présence de 2 mg.l⁻¹. Afin de réduire la concentration en fer présente dans les solutions de surnageants, la concentration de 3 mg.l⁻¹ de fer est retenue.

2.2. Détermination du poids des cellules de BTP1

Le facteur de conversion entre la DO à 600 nm et la concentration massique des cellules de BTP1 a été déterminé à l'aide de 8 cultures différentes de différentes durées allant de 4 à 8 h. Ces durées de cultures ont été choisies, car elles correspondent à la phase exponentielle de la croissance cellulaire et donc à la zone de linéarité.

Les DO à 600 nm et les concentrations massiques pour les 8 cultures sont présentées au tableau 6.

Tableau 6. DO à 600 nm et concentration massique cellulaire de BTP1 (moyenne ± écart type) pour les 7 cultures réalisées avec leurs durées respectives.

Culture	Durée	DO 600 nm	Concentration massique [g.l ⁻¹]
1	4	0,583±0,002	0,313±0,025
2	5	0,855±0,003	0,475±0,029
3	6	0,836±0,001	0,450±0,000
5	6	0,900±0,010	0,500±0,000
5	7	0,977±0,002	0,513±0,048
6	7	1,248±0,007	0,625±0,029
7	8	1,155±0,047	0,600±0,041

Les différents points ont été placés dans un graphique (figure 27) de la concentration massique des cellules de BTP1 en fonction de la DO mesurée à 600 nm. La courbe de tendance linéaire a également été tracée.

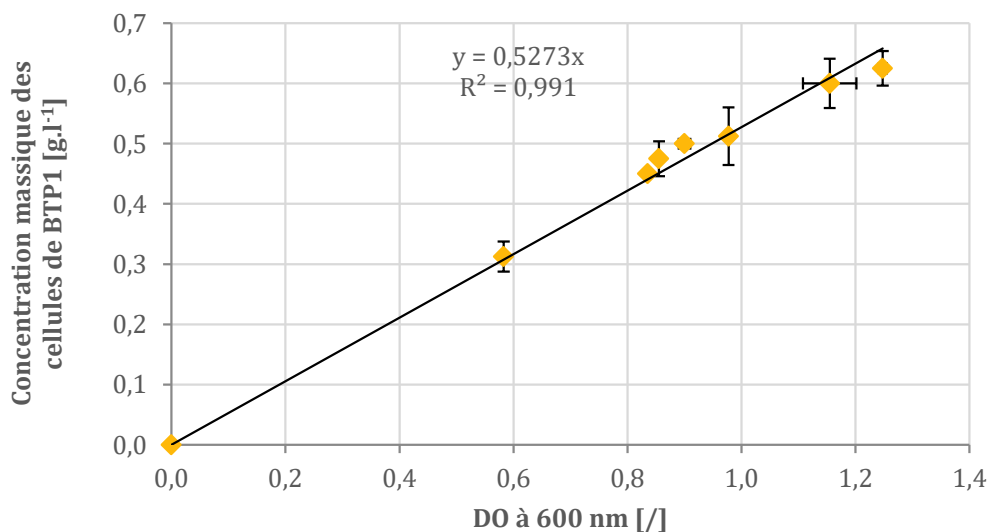


Figure 27. Concentration massique cellulaire en fonction de la DO à 600 nm pour les 7 cultures de BTP1 réalisées et courbe de tendance linéaire avec son équation et son facteur de détermination

La courbe de tendance linéaire présente un coefficient de détermination R^2 de 0,991. Le facteur de conversion entre la DO et la concentration massique des cellules de BTP1 est la pente de la courbe de tendance linéaire à savoir 0,527.

Ce facteur sera utilisé dans la suite des résultats afin d'exprimer la mesure de DO à 600 nm en concentration massique de cellules en $g.l^{-1}$ par simple multiplication de la DO à 600 nm par le facteur.

2.3. Expérience cinétique en fioles

La concentration cellulaire de BTP1 en fonction du temps dans les milieux King B et Casamino Acid avec ou sans fer est illustrée à la figure 28.

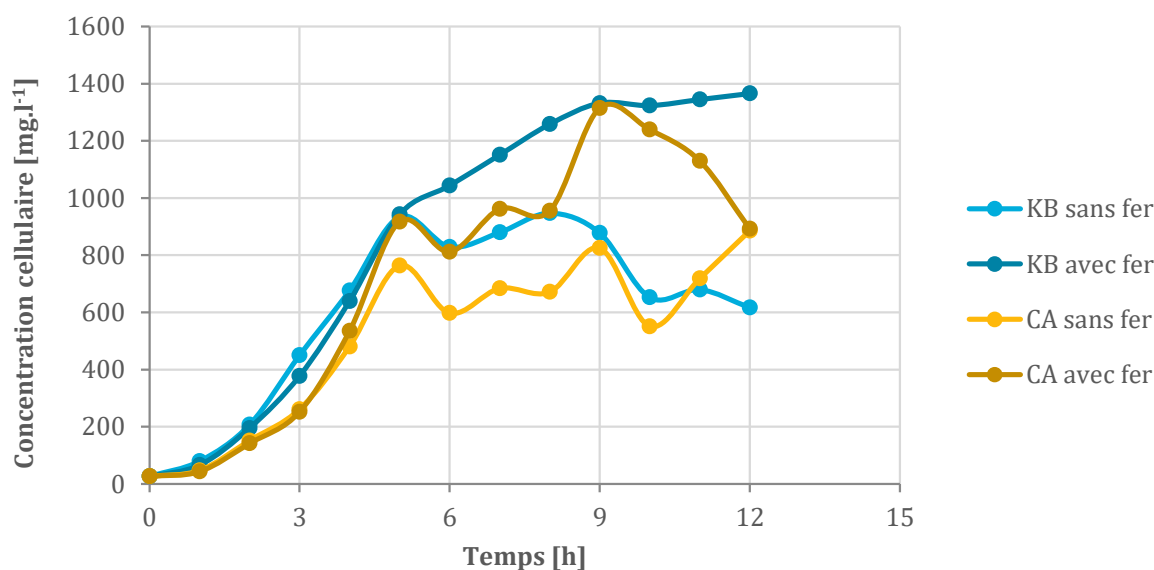


Figure 28. Concentration cellulaire des cultures de BTP1 réalisée en fioles dans les milieux de culture King B (KB) et Casamino Acid (CA) ajoutés ou non d'une concentration en fer de $10,5 mg.l^{-1}$ (avec et sans fer).

Après 12 h de culture, le milieu KB sans fer présente la plus faible croissance cellulaire ($616 mg.l^{-1}$) tandis que le milieu KB avec fer engendre la plus grande croissance cellulaire ($1365,5 mg.l^{-1}$). La croissance cellulaire des deux milieux CA (avec et sans fer) se rejoint après 12 h malgré la plus grande croissance cellulaire dans le milieu CA avec fer avant 12 h. La diminution observée entre la 9^{ème} et la 12^{ème} peut être due à une limitation en nutriments du milieu.

La production de pyoverdine a été analysée par UPLC-MS. Dans les deux milieux avec fer, la concentration en pyoverdine est hors des limites de détection. La concentration est dès lors très faible et est considérée comme nulle. Dans le milieu CA sans fer, une présence de pyoverdine est observée à partir de la 6^{ème} heure de culture. Cependant, aucune production de pyoverdine n'est détectée dans le milieu KB sans fer. Cette absence de pyoverdine peut être due principalement à des erreurs de manipulation ou à une trop grande concentration en fer de base dans le milieu KB due à la pureté des produits.

Au vu de ces résultats, le milieu Casamino Acid est utilisé dans les expériences de production de pyoverdine.

2.4. Expérience cinétique en bioréacteur

2.4.1. Test de différents milieux

Une expérience préalable en bioréacteur a été réalisée en testant le milieu CA et Succ. En effet, la présence d'acide succinique est favorable à la production de sidérophores de certaines souches de *Pseudomonas putida* (Sayyed et al., 2005). Les conditions d'aération et d'agitation sont fixées selon Ongena, 1996. Afin d'optimiser la production de pyoverdine, le milieu CA ainsi que des conditions d'aération et d'agitation plus importantes sont utilisées dans la suite des expériences en bioréacteur. En effet, le milieu CA permet une croissance cellulaire plus rapide et plus élevée ainsi qu'une plus grande production de pyoverdine de la souche BTP1. Ces conditions d'aération et d'agitation étaient insuffisantes et entraînaient un taux en oxygène dissous de 0% dans le milieu après 4h30 de culture. Dès lors, dans ces conditions, le maximum de concentration en pyoverdine atteint est 6,3 mg.l⁻¹ dans le milieu CA. Pour les mêmes conditions d'agitation et d'aération, Ongena, 1996, avait obtenu des concentrations en pyoverdine jusque 80 mg.l⁻¹. La différence si importante peut provenir de l'utilisation de produits chimiques différents, dont ceux utilisés au niveau du milieu de culture, mais également de l'utilisation de bioréacteurs différents. De plus, la souche BTP1 n'a pas été reprise du même cryotube.

2.4.2. Test des conditions d'agitation et d'aération

Suite aux résultats de l'expérience précédente, une aération ainsi que des vitesses d'agitation plus élevées sont appliquées aux cultures du milieu CA avec et sans fer.

Les courbes de concentration cellulaire ainsi que de concentration en pyoverdine obtenues au cours du temps sont illustrées aux figures 29 et 30.

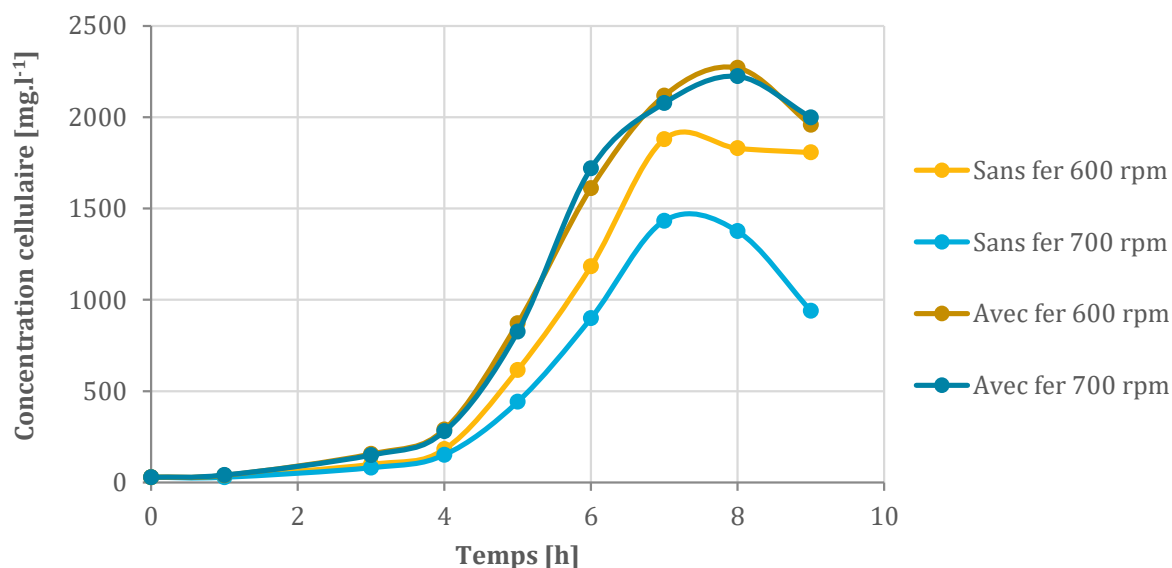


Figure 29. Concentration cellulaire des cultures de BTP1 réalisée en bioréacteur dans le milieu de culture CA ajouté ou non d'une concentration en fer de 10,5 mg.l⁻¹ (avec et sans fer) et soumises à une agitation de 600 ou de 700 rpm.

Une première observation est que les bactéries BTP1 ont une croissance cellulaire plus élevée sous ces conditions d'aération et d'agitation que lors de l'expérience précédente. En effet, les

maxima de concentration cellulaire sont de 1880 et 1432 mg.l⁻¹ dans le milieu CA sans fer et de 2269 et 2223 mg.l⁻¹ dans le milieu CA avec fer, respectivement à 600 et 700 rpm. Au niveau de l'expérience présence, pour le milieu CA sans et avec fer, les maxima n'étaient que de 1115 et 995 mg.l⁻¹. Des conditions d'aérations et de vitesse d'agitation plus élevée permettent donc une meilleure croissance cellulaire de la souche BTP1.

Dans le milieu CA avec fer, la vitesse d'agitation a une influence négligeable sur la croissance cellulaire et les deux courbes se superposent. Par contre, au niveau des milieux sans fer, une agitation de 600 rpm entraîne une plus grande croissance cellulaire de BTP1 et donc une plus grande concentration cellulaire après 9 h de culture.

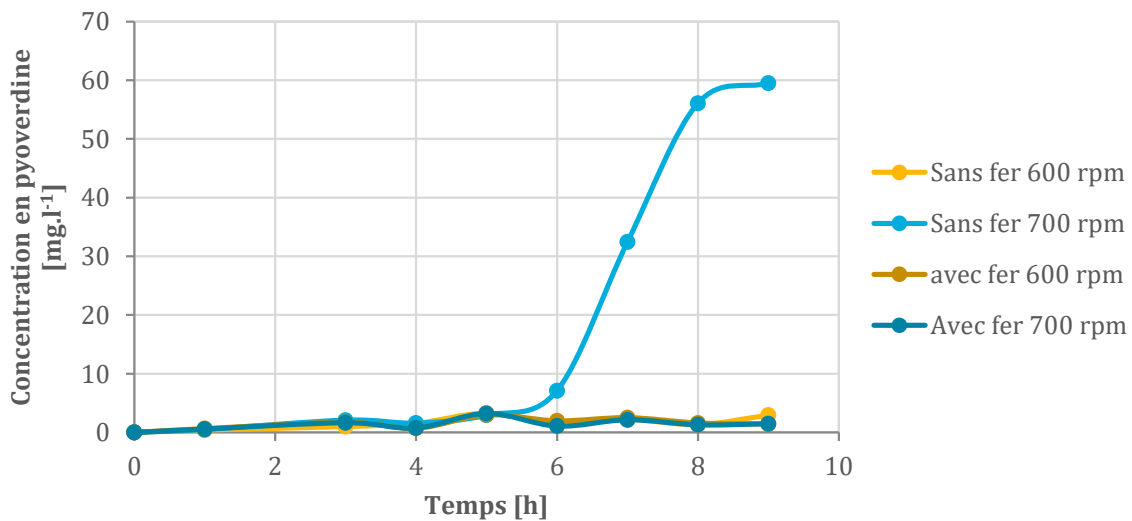


Figure 30. Concentration en pyoverdine des cultures de BTP1 réalisée en bioréacteur dans le milieu de culture CA ajouté ou non d'une concentration en fer de 10,5 mg.l⁻¹ (avec et sans fer) et soumises à une agitation de 600 ou de 700 rpm.

La concentration en pyoverdine reste proche de zéro pour les milieux avec fer, mais également pour le milieu sans fer avec une vitesse d'agitation de 600 rpm. Cependant, la croissance cellulaire est plus élevée dans le milieu sans fer à 600 rpm qu'à 700 rpm. Une plus grande concentration en pyoverdine était donc attendue. Ce résultat s'explique pour une erreur de manipulation. En effet, en raison d'une mauvaise inoculation du milieu, le bioréacteur a dû être vidé. Lors de cette étape, le bioréacteur a pu être contaminé. De plus, un milieu CA plus ancien que dans les autres bioréacteurs a été utilisé afin de recommencer la culture.

Au niveau du bioréacteur contenant le milieu sans fer avec une agitation de 700 rpm, la concentration en pyoverdine augmente au cours du temps pour atteindre 55,5 mg/l⁻¹. La plus grande aération et vitesse d'agitation ont donc permis d'atteindre un maximum de concentration en pyoverdine de presque neuf fois supérieur par rapport aux conditions de l'expérience précédente.

Les mêmes conditions d'aération et d'agitation ont été utilisées dans la suite des expériences de production de pyoverdine.

2.4.3. Essai de production de pyoverdine

Des cultures en bioréacteurs ont été réalisées avec le milieu CA, une aération de 2 VVM ainsi qu'une agitation de 700 rpm, car ces conditions de culture permettaient la meilleure production de pyoverdine dans les tests antérieurs. Deux cultures ont été réalisées avec du CA sans fer (bioréacteur 1 et 2) et deux cultures avec du CA avec fer (bioréacteur 3 et 4).

Cependant, après 10 h de culture, la concentration en pyoverdine dans les milieux sans fer ne dépassait pas 30 mg.l⁻¹. De plus, seulement 200 ml peuvent être extraits de chaque production en bioréacteur. Afin d'obtenir la quantité nécessaire à l'expérience de dissolution de la goethite et de solubilisation du phosphore (4 l), la production en bioréacteur aurait dû être recommencée 20 fois. Cette perspective était toutefois inenvisageable en raison de contrainte de temps et de disponibilité des bioréacteurs.

2.5. Production de pyoverdine en fioles

Des cultures en fioles de 2 l ont été réalisées afin de produire une plus grande quantité de pyoverdine que celle obtenue lors des expériences en bioréacteur. Deux cultures sont réalisées avec fer (1 et 2) et deux autres sans fer (3 et 4). Les densités optiques mesurées à 400 nm ainsi que les concentrations en pyoverdines des 4 cultures sont données au tableau 7.

Tableau 7. DO à 400 nm mesurée et concentration massique en pyoverdine calculée pour les quatre cultures en fioles de deux litres réalisées.

Culture	DO 400 nm	Concentration en pyoverdine [mg.l ⁻¹]
1	0,12	4,32
2	0,09	3,24
3	3,58	149,85
4	2,91	122,03

Cette hausse de la concentration en pyoverdine est en partie due à l'augmentation du pH des milieux. En effet, dans les expériences en bioréacteur, le pH est maintenu à 7. Cependant, lors de cultures en fioles, le pH augmente jusqu'à environ 8,5 après 12 h de culture. En effet, le pH joue un rôle important sur la disponibilité du fer pour les organismes. En étudiant la production de sidérophores issus de bactéries variées, (Chaudhary et al., 2017) ont trouvé que la production de sidérophores est plus grande à pH 9 qu'à pH 7. De plus, le pH 9 permet le maximum de production de sidérophores.

2.6. Détermination de la force ionique

La même force ionique doit être présente dans l'ensemble des solutions appliquées à la goethite au niveau des expériences de solubilisation du fer et du phosphore. En effet, la force ionique des solutions influence la dissolution de la goethite ainsi que la désorption des ions phosphates (Robin et al., 2008). Une force ionique est déjà présente dans les surnageants de culture CA en raison de la présence de 0,25 g.l⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Cette concentration correspond à 24,6 mg Mg.l⁻¹

¹ de milieu. Après culture, une partie du $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a été consommée et il est donc nécessaire de déterminer la concentration restante à la fin de la culture.

Les concentrations en magnésium des quatre surnageants des cultures issues de la troisième expérience en bioréacteur sont comprises entre 16,5 et 20,44 mg.l^{-1} . Ces valeurs correspondent à des concentrations en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0,17 et de 0,21 g.l^{-1} . Un test de dissolution de la goethite est alors réalisé avec plusieurs solutions d'eau ultra pure comportant des concentrations en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0,17, 0,21 et 0,25 g.l^{-1} . Les résultats de dosage en fer en millimoles de fer par kilogrammes de goethite de ces différentes solutions sont inscrits dans le tableau 8.

Tableau 8. Concentration en fer dissous à partir de la goethite mise dans des solutions ayant des forces ioniques de 0, 0,17, 0,21 et 0,25 g.l^{-1}

Concentration en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [g.l^{-1}]	Concentration en fer dissous [mmol Fe kg^{-1}]
0	2,42
0,17	-0,76
0,21	-0,67
0,25	-0,72

Les valeurs négatives peuvent être obtenues en raison d'étalon présentant des concentrations légèrement plus hautes que leur valeur. Ces valeurs peuvent donc être approximées proche de zéro. Ces résultats montrent qu'une concentration de 0,17 g.l^{-1} de en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ne permet pas la dissolution de la goethite. La force ionique de l'eau ultra pure ayant une concentration de 0,17 g.l^{-1} en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ est alors suffisante afin de ne pas entraîner la dissolution de la goethite.

3. Test de dissolution de la goethite

Les résultats du premier test de dissolution de la goethite par une solution de pyoverdine, de surnageant et d'eau ultra pure sont présentés à la figure 31.

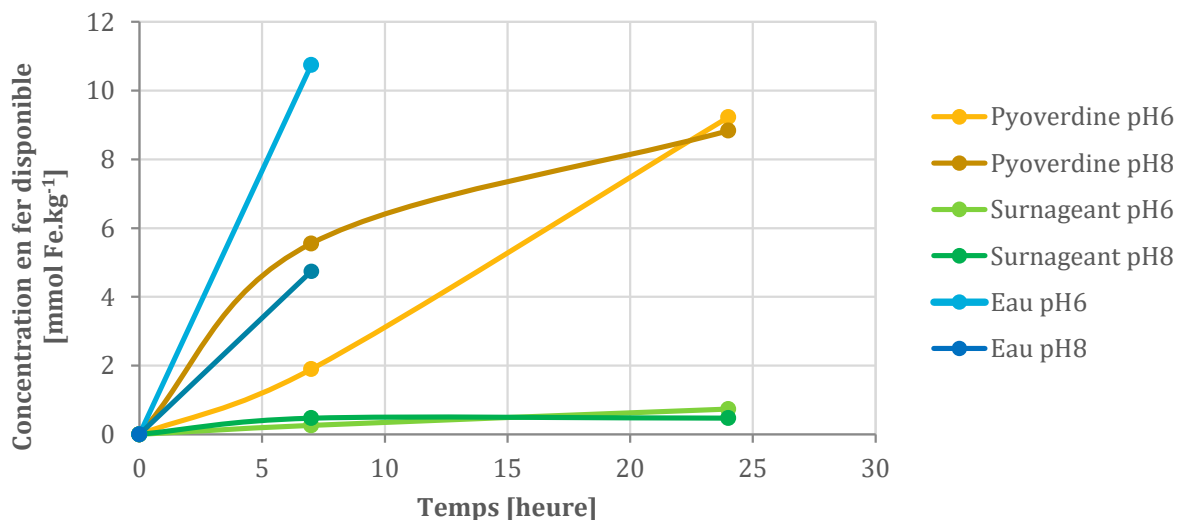


Figure 31. Concentration en fer disponible dans les solutions de pyoverdine, surnageant et eau ultra pure à pH 6 et 8 en fonction du temps

Les concentrations en fer dissous après 24 h sont plus élevées dans les solutions de pyoverdine que dans les solutions de surnageant. Cette observation montre que les pyoverdines ont un impact positif sur la dissolution de la goethite en se complexant avec les ions ferriques. Les solutions de surnageant, pouvant contenir d'autres agents chélatants comme des acides organiques, ont un très faible effet sur la dissolution de la goethite.

Les solutions d'eau ultra pure, après 7h, présentent également une grande concentration en fer dissous. Cependant, l'impact des solutions d'eau ultra pure sur la dissolution de la goethite était attendu très faible. La grande solubilisation du fer par les solutions d'eau est expliquée par la très faible force ionique. En effet, comme vu au point 2.6 de la section résultats et discussion, les solutions de pyoverdine et de surnageant ont des forces ioniques de 16,7 et 20,7 g.l⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Les solutions d'eau ultra pure n'ont cependant pas cette force ionique. Une diminution ou absence de force ionique entraîne une augmentation des activités des ions ferriques qui vont alors diffuser dans la solution. Dans cette expérience, aucune force ionique provenant du MgSO₄.7H₂O n'avait encore été ajoutée à l'eau ultra pure. L'ajout d'une force ionique à l'eau ultra pure, semblable à celle retrouvée dans les solutions de surnageant, a été réalisé dans les expériences suivantes, à la suite des résultats de cette expérience-ci.

Après 24 h, la solution de pyoverdine à pH 6 a une concentration en fer disponible supérieure à la solution de pyoverdine à pH 8. Le pH des solutions joue donc un rôle sur l'efficacité de la pyoverdine et sur la dissolution de la goethite. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette tendance. Tout d'abord, à pH 6, la goethite, plus éloignée de son point de charge nulle, possède une charge positive de surface plus forte qu'à pH 8. En effet, l'espèce de goethite la plus présente entre pH 6 et 8 est Fe(OH)₂⁺. Cependant, à pH 6, cette espèce est plus présente (10⁻¹⁰ M à pH 6 contre 10⁻¹² M à pH 8). De plus, la deuxième espèce la plus présente à pH 6 est Fe(OH)₂⁺ (10⁻¹² M) alors qu'à pH 8, la deuxième espèce la plus présente est Fe(OH)₄⁻ (10⁻¹³ M) (Lindsay, 1980; Lindsay et al., 1982; Robin et al., 2008). Ainsi, les pyoverdines, chargés négativement, sont plus fortement attirés par la surface de la goethite à pH 6. De plus, la solubilité ainsi que le taux de dissolution de la goethite augmentent avec la diminution du pH. À pH 6, la goethite est donc plus soluble qu'à pH 8. En effet, l'activité des ions ferriques est de 10⁻⁹ M à pH 3,5 et seulement 10⁻²⁴ M à pH 8 (Lindsay et al., 1982). De plus, la quantité de fer soluble total en solution (en équilibre avec la goethite) atteint un minimum lorsque le pH augmente jusque 8 (Lindsay et al., 1982).

Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. Seulement deux durées ont été analysées, des courbes ont donc été dessinées à partir de ces deux points, mais l'allure de celles-ci ne représente pas assurément la réalité. De plus, une seule répétition de chaque modalité a été réalisée ne permettant pas de connaître la fiabilité des mesures.

4. Dissolution de la goethite et co-solubilisation du phosphore

Les concentrations en fer et en phosphore des trois types de goethite sont représentées au tableau 9. Ces concentrations représentent les concentrations maximales des solutions lorsque l'ensemble du fer et du phosphore issus de la goethite sont solubilisés.

Tableau 9. Concentration en fer et en phosphore maximale présente sur la goethite pure ainsi que sur les goethites sorbées à pH 6 et à pH 8

Goethite	Concentration maximale en fer [mmol Fe.kg ⁻¹]	Concentration maximale en phosphore [mmol P.kg ⁻¹]
Pure	8911,571	105,312
Sorbée pH 6	9454,741	338,997
Sorbée pH 8	8947,384	432,625

Les solutions de pyoverdine, surnageant, oxalate et ascorbate à pH 6 et à pH 8 possèdent des concentrations initiales en fer et en phosphore différentes indiquées au tableau 10.

Tableau 10. Concentrations en fer et en phosphore retrouvées initialement dans les solutions de pyoverdine, de surnageant, d'oxalate, d'ascorbate et d'eau à pH 6 et 8

Solutions	Concentration en fer [mmol Fe.kg ⁻¹]		Concentration en phosphore [mmol P.kg ⁻¹]	
	pH 6	pH 8	pH 6	pH 8
Pyoverdine	1,236	1,023	4120,239	4174,048
Surnageant	2,984	3,667	4197,109	4289,353
Oxalate	2,430	2,260	10,685	36,129
Ascorbate	2,302	2,260	10,916	10,839
Eau	0,895	0,895	1,537	1,845

Ces concentrations sont soustraites des résultats de concentration en fer et en phosphore obtenus par l'ICP-OES pour l'expérience de dissolution de la goethite et de co-solubilisation du phosphore.

4.1. Dissolution de la goethite

4.1.1. Dissolution de la goethite pure

Les résultats de la dissolution de la goethite pure par les solutions de pyoverdine, surnageant, d'oxalate, d'ascorbate et d'eau à pH 6 et 8 en fonction du temps sont représentés aux figures 32 et 33.

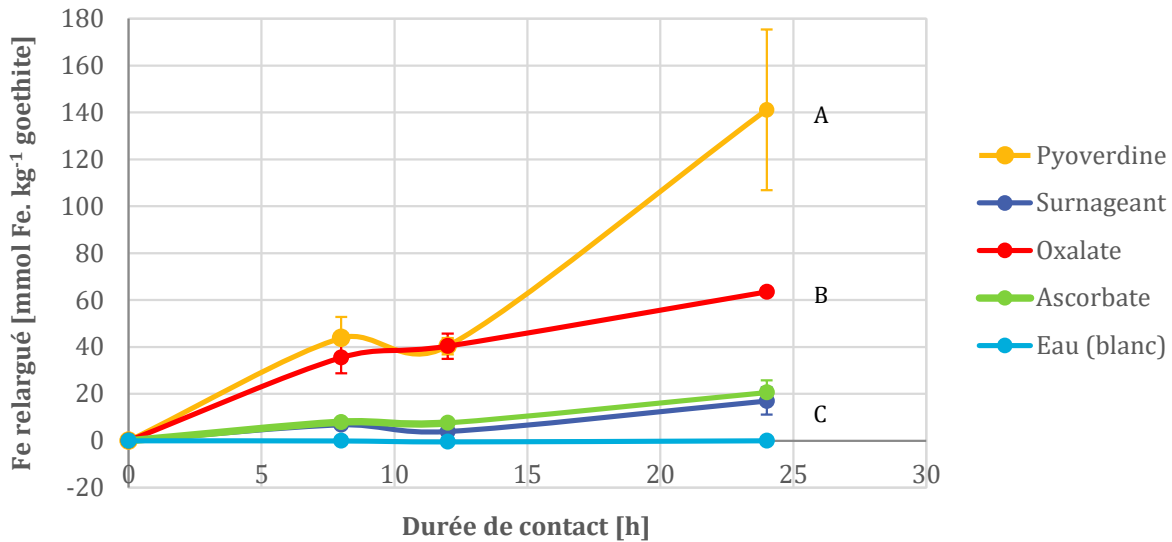


Figure 32. Fer soluble cumulé relargué par unité de goéthite pure à pH 6 en fonction de la durée de contact entre les solutions et la goéthite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes

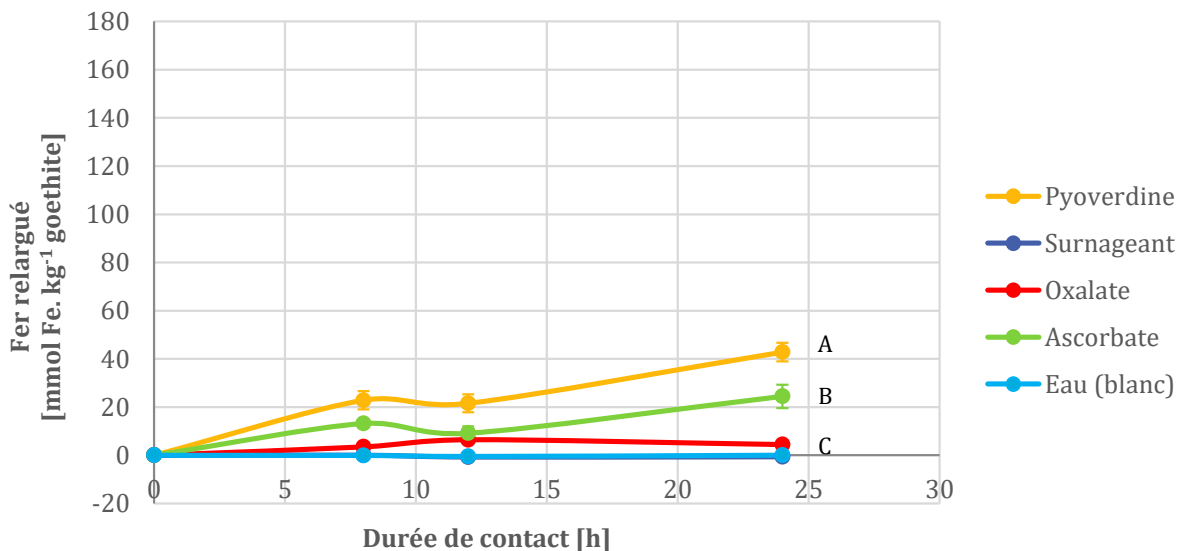


Figure 33. Fer soluble cumulé relargué par unité de goéthite pure à pH 8 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goéthite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes

L'effet des différentes solutions sur la dissolution de la goéthite après 24 h présente des différences très hautement significatives ($p < 0,001$) à pH 6 et à pH 8.

À pH 6 et après 24 h, le fer relargué est significativement plus élevé dans la solution de pyoverdine puis dans celle d'oxalate que dans les autres solutions avec des valeurs de respectivement 141,16 et 63,49 mmol Fe.kg⁻¹. Ces valeurs représentent une dissolution de 1,58% et 0,71% de la goéthite. Herman et al, 1995 avaient obtenu une solubilisation de 0,17% du fer solide total sous forme d'hématite mise en contact avec une solution de sidérophores.

Le fer relargué dans les solutions d'ascorbate, de surnageant et d'eau ne présente pas de différences significatives.

À pH 8 et après 24 h, le fer relargué est également significativement plus élevé dans la solution de pyoverdine que dans les autres solutions avec une valeur de 42,81 mmol Fe.kg⁻¹. La deuxième solution à solubiliser la plus grande quantité de fer est l'ascorbate. Les solutions de surnageant, d'oxalate et d'eau ne présentent pas de différences significatives.

Ainsi, à pH 6 et à pH 8, la solution de pyoverdine est plus efficace dans la dissolution de la goethite que les autres solutions. En effet, la pyoverdine a une plus grande constante de stabilité avec les ions ferriques (10³²) que les acides organiques comme l'oxalate, le malate ou le citrate (10⁸, 10⁷ et 10¹¹ respectivement) (Meyer et al., 1978; Lindsay et al., 1982; Takahashi et al., 1997). De plus, la pyoverdine a une plus grande spécificité pour les ions ferriques que les acides organiques en raison d'une chélation préférentielle aux ions ferriques et à la reconnaissance des complexes fer-pyoverdine au niveau des cellules (Ams et al., 2002; Cornelis, 2008). De nombreux articles obtiennent également une plus grande concentration en fer soluble en présence de sidérophores que d'acides organiques (Lindsay et al., 1982; Hersman et al., 1995; Kraemer, 2004; Kraemer et al., 2006). Les solutions d'eau et de surnageants présentent la plus faible dissolution de la goethite. La solution d'eau ne présente pas de ligands, expliquant la dissolution de la goethite proche de zéro. La solution de surnageant peut quant à elle contenir des métabolites secondaires de *Pseudomonas putida* susceptibles d'influencer la dissolution de la goethite comme certains acides organiques, des phénazines, des quinolines, des composés réducteurs (ascorbate, acide 2,6-pyridinedicarbothioïque et composés phénoliques) (Budzikiewicz, 1993; Robin et al., 2008). Cependant, la présence de ces métabolites secondaires ne permet pas une dissolution significative de la goethite dans cette expérience. Une explication serait la trop faible concentration de ces molécules dans la solution de surnageant ou l'inhibition de la production en raison de la grande concentration en fer retrouvé dans le milieu Casamino Acid.

Le pH des solutions engendre des différences très hautement significatives au niveau de la dissolution de la goethite. Les quantités de fer solubilisé dans les solutions de pyoverdine et d'oxalate sont significativement plus élevées à pH 6 qu'à pH 8. En effet, 141,2 et 63,49 mmol Fe.kg⁻¹ sont solubilisées à pH 6 contre 42,81 et 4,46 mmol Fe.kg⁻¹ respectivement dans les solutions de pyoverdine et d'oxalate. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'influence du pH sur la dissolution de la goethite comme mentionné au point 3 de la section V. Tout d'abord, la goethite a une plus faible solubilité et donc à un taux de dissolution plus faible à pH 8 qu'à pH 6 (Lindsay et al., 1982; Yoshida et al., 2002). De plus, à pH 6, la goethite possède une plus grande charge de surface positive qu'à pH 8, proche du point de charge nulle. Le taux de dissolution des oxydes de fer est minimal au point de charge nulle (Biber et al., 1994). Les pyoverdines, chargées négativement sont donc plus fortement attirés par la surface de la goethite à pH 6 qu'à pH 8 (Kraemer, 2004; Robin et al., 2008). Ensuite, la capacité des anions organiques à former des complexes diminue avec le pH (Jones, 1998). L'affinité de l'oxalate pour les ions ferriques diminue fortement avec le pH et atteint un minimum à pH 8,5, expliquant la diminution drastique du fer relargué à pH 8 (Kraemer, 2004). L'ascorbate montre une dissolution de la goethite plus constante avec la variation de pH.

Enfin, la pyoverdine est très instable en solution aqueuse et surtout en milieu faiblement alcalin entraînant une dégradation chimique de la pyoverdine en plusieurs produits de décomposition pigmentaire (Meyer et al., 1978).

La quantité de fer solubilisé par la solution d'ascorbate n'est pas significativement différente à pH 6 qu'à pH 8. En effet, 20,56 et 24,46 mmol Fe.kg⁻¹ sont relarguées respectivement à pH 6 et 8. La variation de pH entre pH 6 et 8 n'influence donc pas l'efficacité de l'ascorbate à dissoudre la goethite contrairement à l'oxalate ou aux pyoverdines. Une explication à cette différence est que l'oxalate et les pyoverdines dissolvent la goethite majoritairement par dissolution contrôlée par les ligands en complexant les ions ferriques à la surface de la goethite (Kraemer et al., 1997; Reichard et al., 2007; Robin et al., 2008). Cependant, l'ascorbate n'est pas un fort complexant anionique, mais un fort réducteur du fer. Le principal mécanisme de dissolution de l'ascorbate est une dissolution réductive pendant laquelle l'ascorbate réduit les ions ferriques à la surface des oxydes de fer et forme des complexes avec les ions ferreux ainsi formés. Ce mécanisme se produit malgré la présence d'oxygène dans le milieu (Reyes et al., 1997). Ainsi, l'effet de l'ascorbate sur la dissolution de la goethite n'est pas influencé par le pH dans la solution, dans une gamme de pH allant de 6 à 8.

4.1.2. Dissolution de la goethite avec ions phosphates

Les résultats de la dissolution de la goethite sorbée par les solutions de pyoverdine, surnageant, d'oxalate, d'ascorbate et d'eau à pH 6 et 8 en fonction du temps sont représentés aux figures 34 et 35.

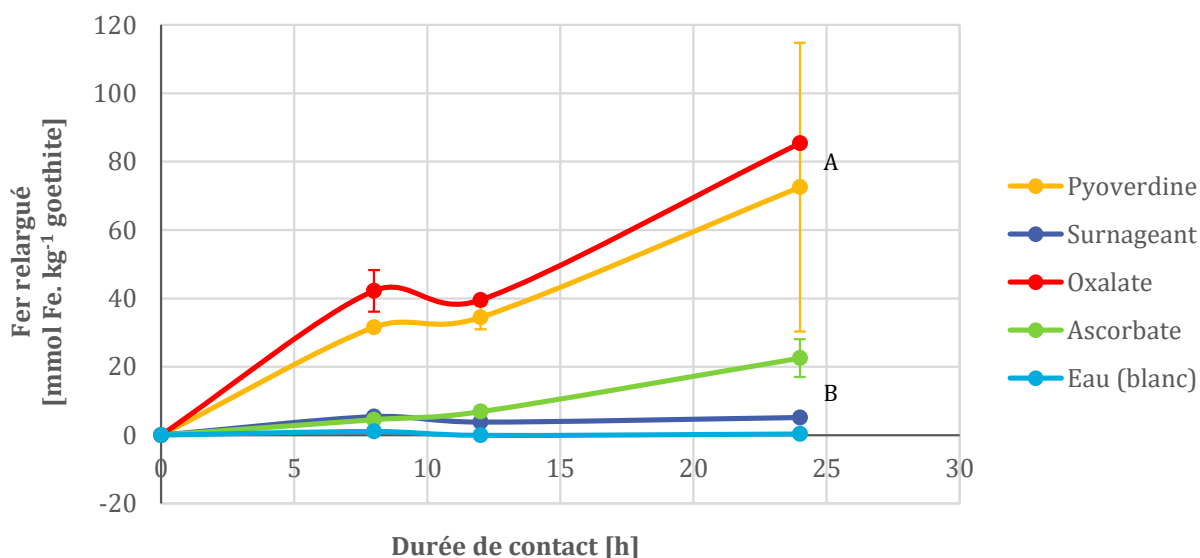


Figure 34. Fer soluble cumulé relargué par unité de goethite sorbée à pH 6 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

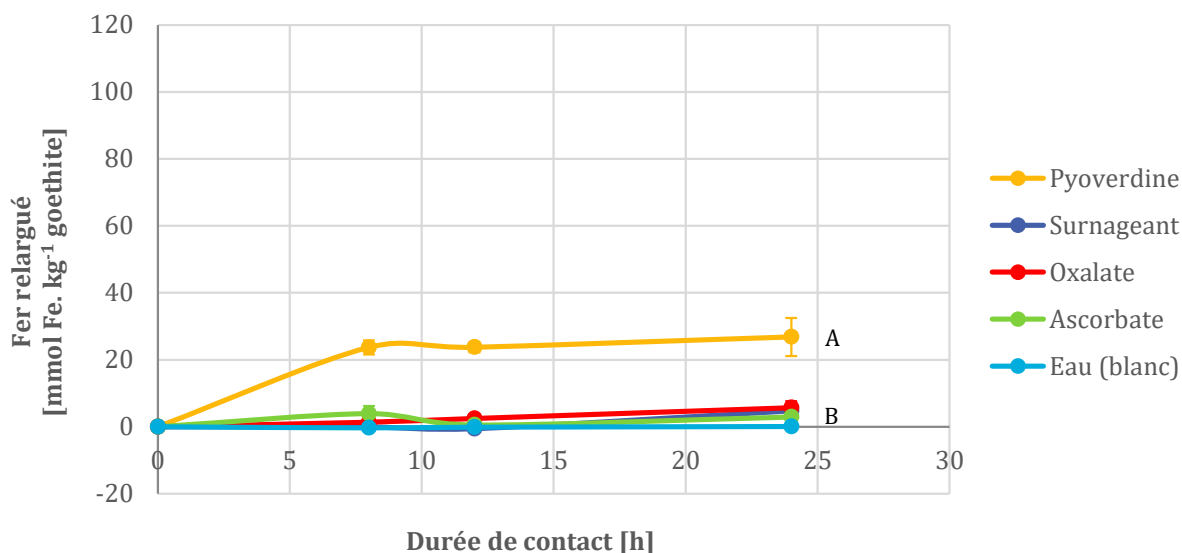


Figure 35. Fer soluble cumulée relargué par unité de goethite sorbée à pH 8 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

Au niveau des goethites sorbées, les quantités de fer relarguées possèdent également des différences très hautement significatives en fonction de la solution et du pH ($p < 0,001$). À pH 6, les solutions de pyoverdine et d'oxalate ne présentent pas de différence significative entre elles ($p > 0,05$), mais permettent une dissolution de la goethite significativement plus élevée que les autres solutions. Après 24 h, 85,38 et 72,52 mmol Fe.kg⁻¹ sont relarguées par la solution d'oxalate et de pyoverdine respectivement. Les trois autres solutions ne présentent pas de différences significatives. À pH 8, la solution de pyoverdine permet une dissolution de la goethite significativement plus élevée que les autres solutions, ne présentant pas de différence significative entre elles. De plus, les quantités de fer relargué sont également plus élevées à pH 6 qu'à pH 8 uniquement pour les solutions de pyoverdine et d'oxalate. Ces résultats présentent donc les mêmes tendances que ceux de la goethite pure.

L'adsorption préalable d'ions phosphates à la surface de la goethite (goethite sorbée) à une influence très hautement significative ($p < 0,001$) sur la dissolution de la goethite. À pH 6, la quantité de fer relargué par les solutions de pyoverdine diminue en présence de la goethite sorbée par rapport à la goethite pure. Les pourcentages de fer solubilisé grâce aux pyoverdines 0,77% en présence de la goethite sorbée et de 1,58 % en présence de la goethite pure. De plus, la même observation est réalisée à pH 8 pour la solution d'ascorbate avec un pourcentage de goethite dissous passant de 0,27 à 0,03 %, respectivement pour la goethite pure et sorbée. Cette observation peut être expliquée par le point de charge nulle de la goethite. En effet, sur la goethite pure, le point de charge nulle de la goethite est d'environ 8,1. Avec les ions phosphates chargés négativement adsorbés à la surface de la goethite, le point de charge nulle diminue et peut tomber jusqu'à 5,1 (Parfitt et al., 1976). La surface de la goethite étant plus faiblement chargée positivement, les pyoverdines et l'ascorbate sont moins adsorbés à la surface de la goethite afin de complexer le fer. De plus, les ions ferriques sont moins accessibles en raison de la présence des ions phosphates qui bloque les sites de surface (Biber et al., 1994). Enfin, à la surface de la goethite, un ion phosphate se complexe avec deux ions ferriques, formant ainsi des complexes de

surface binucléaires (Parfitt et al., 1976; Biber et al., 1994). L'énergie d'activation nécessaire au décrochage de deux centres métalliques de la surface de la goethite augmente alors fortement. L'adsorption des ions phosphates à la surface de la goethite entraîne une inhibition des dissolutions non réductives et réductives de la goethite (Biber et al., 1994).

4.2. Solubilisation du phosphore

Les quantités de phosphore soluble relargué par kilogrammes de goethite dans les solutions de pyoverdine, de surnageant, d'oxalate, d'ascorbate et d'eau, respectivement à pH 6 et à pH 8 en fonction du temps sont représentées aux figures 36 et 37.

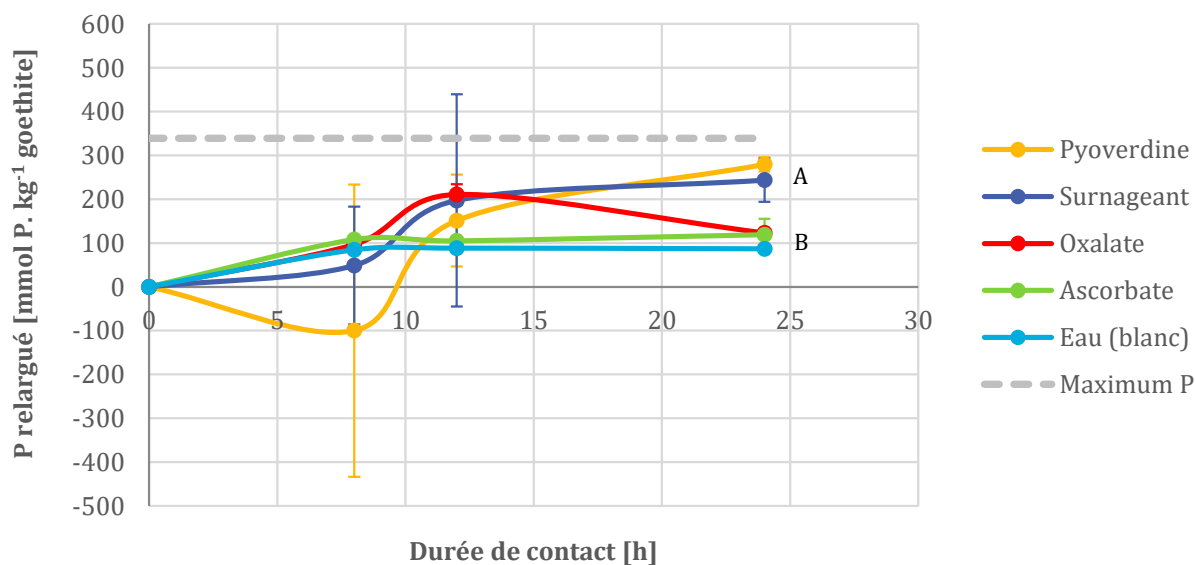


Figure 36. Phosphore soluble cumulé relargué par unité de goethite sorbée à pH 6 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

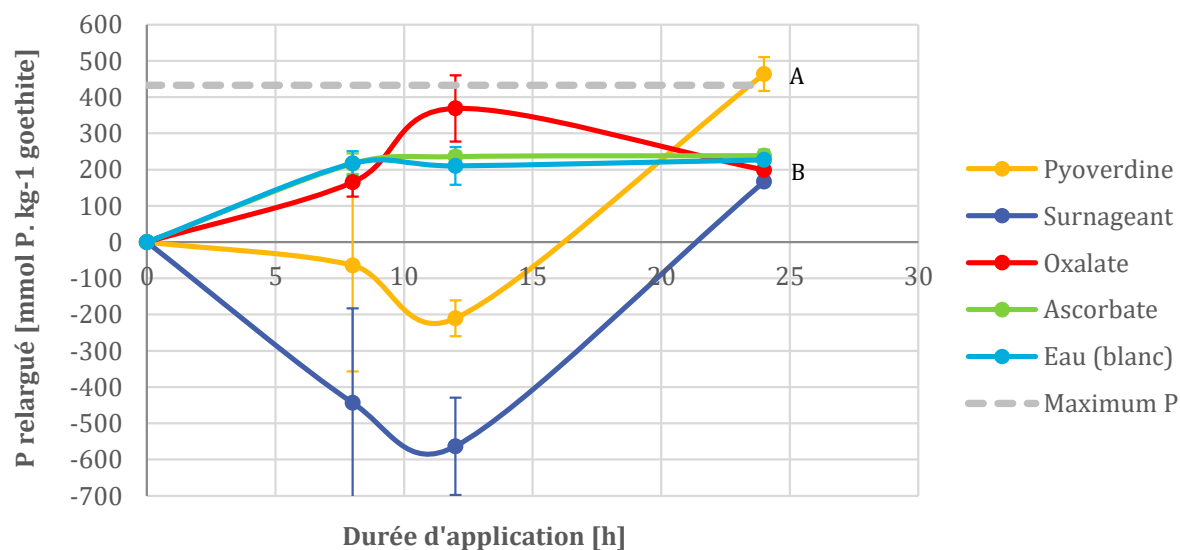


Figure 37. Phosphore soluble relargué par unité de goethite sorbée à pH 8 en fonction de la durée de contact entre les différentes solutions et la goethite. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

À pH 6 et après 24 h, la quantité de phosphore solubilisé est très hautement significativement plus élevée ($p < 0.001$) dans la solution de pyoverdine et de surnageant que dans l'ensemble des autres solutions. À pH 8 et après 24 h, la solution de pyoverdine engendre une solubilisation du phosphore très hautement significativement plus élevée ($p < 0.01$) que les autres solutions. La quantité de phosphore solubilisée par la solution de pyoverdine est de 279,3 et de 463,78 mmol P kg⁻¹ respectivement à pH 6 et 8. Exprimé en pourcentage, 82,4 % du phosphore total présent sur la goethite a été solubilisé à pH 6 et 107,2% à pH 8. Cette valeur supérieure à 100% peut provenir d'une sous-estimation du phosphore total adsorbé sur la goethite par le protocole de l'attaque triacide ainsi que par les mesures réalisées par l'ICP, mais aussi d'une surestimation du phosphore solubilisé par les mesures de l'ICP. En effet, l'écart-type de la mesure est de 88,4 mmol P kg⁻¹. La solution contenant la pyoverdine permet donc de solubiliser une très grande partie des ions phosphates adsorbés au niveau de la goethite. À pH 6, la solution de surnageant permet également une grande solubilisation du phosphore avec un maximum de 243,4 mmol P kg⁻¹ ce qui correspond à 71,8 % du phosphore total présent sur la goethite, malgré une très faible dissolution de la goethite. Les composés présents dans la solution de surnageant comme des acides organiques, des phosphatases ou encore des cellulases aurait donc une plus grande action au niveau de la solubilisation du phosphore que du fer.

Les solutions d'oxalate, d'ascorbate et d'eau à pH 6 ainsi que les solutions de surnageants, d'oxalate, d'ascorbate et d'eau à pH 8 ne présentent pas de différences significatives ($p > 0.05$) au niveau de la solubilisation du phosphore. Ces résultats montrent que, dans les conditions de l'expérience, les acides organiques oxalates et ascorbates à pH 6 et les molécules contenues dans la solution de surnageant à pH 8 n'auraient donc pas d'effet sur la solubilisation du phosphore. Cependant, la quantité de phosphore solubilisé dans la solution de surnageant à pH 8 est en pleine augmentation après 24 h. Une durée de contact plus longue aurait pu permettre une plus grande solubilisation du phosphore. Au contraire, le phosphore soluble dans la solution d'oxalate diminue entre 12 et 24 h aux deux pH. Cette diminution pourrait être due à une réadsorption des ions phosphates par la goethite et leur fixation par des cations présents en solution comme le sodium, le potassium ou encore le magnésium.

L'effet du pH influence très hautement significativement ($p < 0.001$) le phosphore solubilisé par les solutions. En effet, une quantité de phosphore significativement plus élevée est solubilisée à pH 8 qu'en pH 6 pour toutes les solutions sauf la solution de surnageant qui ne présente pas de différence significative en fonction du pH ($p > 0,05$). Cette augmentation est principalement expliquée par la charge de surface de la goethite qui est de moins en moins positive lorsque le pH augmente et s'approche du point de charge nulle. Les ions phosphates chargés négativement sont donc moins fortement retenus à la surface de la goethite et se désorbent plus facilement à pH 8 qu'à pH 6.

Ces résultats montrent que les pyoverdines, en solubilisant le fer présent au niveau de la goethite, permettent une co-solubilisation efficace des ions phosphates adsorbés sur la goethite.

À pH 6, une diminution de la quantité de phosphore soluble est observée jusqu'à 8 h dans la solution de pyoverdine. De même, à pH 8, une diminution de la quantité de phosphore soluble est présente jusqu'à 12 h pour la solution de pyoverdine et de surnageant. Ces diminutions peuvent

provenir d'une adsorption à la surface de la goethite des ions phosphates initialement présents dans les solutions de pyoverdine et de surnageant. En effet, des concentrations de l'ordre de 4000 mg P.kg⁻¹ de goethite sont présentes initialement dans ces deux solutions en raison de la présence de K₂HPO₄ dans la recette du milieu CA. De plus, les diminutions de la quantité de phosphore soluble sont plus fortes à pH 8 qu'à pH 6. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence de cations Mg²⁺ issu du MgSO₄ présent en solution à une teneur de 190,24 mmol Mg.kg⁻¹ de goethite. En effet, avec l'augmentation du pH, la goethite possède de plus en plus de charges négatives à sa surface à avec une charge superficielle de surface de moins en moins positive jusqu'au point de charge nulle. Les cations Mg²⁺ pourraient dès lors former des ponts cationiques entre la surface de la goethite et les ions phosphates chargés négativement.

En posant l'hypothèse que la composition des solutions de pyoverdine et de surnageant est identique, excepté au niveau de la concentration en pyoverdine, l'effet des pyoverdines peut être déduit. En effet, une soustraction de la solubilisation du phosphore obtenue avec la solution de pyoverdine par celle obtenue avec la solution de surnageant donne l'effet des pyoverdines seuls sur la solubilisation du phosphore. Une solution de pyoverdine purifiée à une concentration de 3,43 x 10⁻⁵ M serait alors capable de solubiliser 35,9 mmol P.kg⁻¹ à pH 6 et 297,23 mmol P.kg⁻¹ à pH 8. Ces valeurs représentent un pourcentage de phosphore solubilisé de 10,8 % et 68,7 % respectivement à pH 6 et 8.

4.3. Co-solubilisation du fer et du phosphore

Le rapport du nombre de millimoles de phosphore solubilisé par le nombre de millimoles de fer solubilisé dans la solution après 24 h a été calculé pour l'ensemble des solutions ainsi que pour les deux pH. Ce rapport permet de visualiser la co-solubilisation des ions ferriques et des ions phosphates en solution ainsi que de mieux comprendre les mécanismes de solubilisation qui entrent en jeu. Les ratios des solutions de pyoverdine, de surnageant, d'oxalate et d'ascorbate, respectivement à pH 6 et 8 sont présentés aux figures 38 et 39.

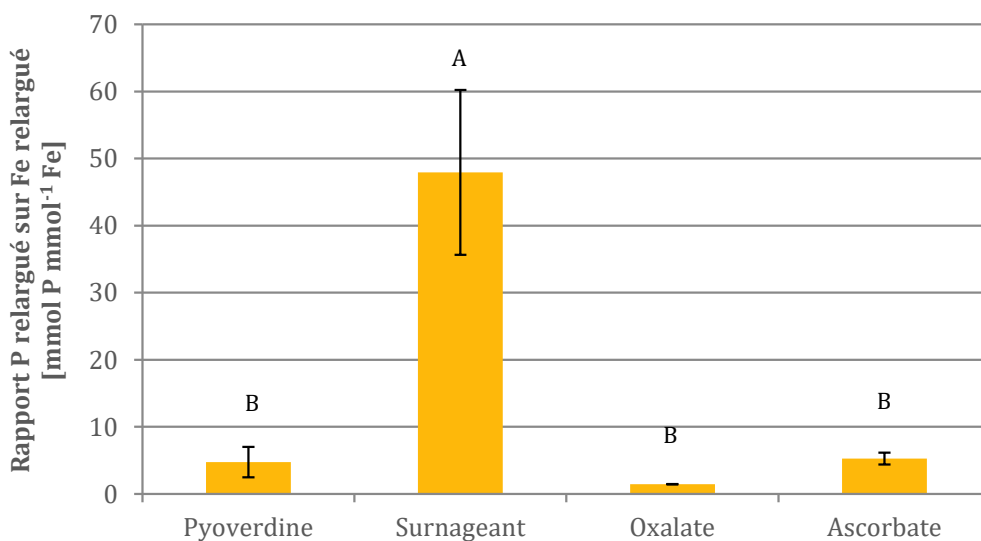


Figure 38. Ratio de la quantité de phosphore soluble relargué sur la quantité de fer soluble relargué de la goethite sorbée à pH 6 après 24 h. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

À pH 6, le ratio de la solution de surnageant est hautement supérieur ($p < 0,001$) aux ratios des autres solutions, qui ne présentent pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre eux. Malgré cela, de faibles différences sont observables entre les solutions. La solution de sidérophores entraîne un ratio de $4,73 \text{ mmol P mmol}^{-1} \text{ Fe}$ en raison d'une grande solubilisation du fer et du phosphore. Le surnageant a quant à lui un ratio de $47,93$ dû à une grande solubilisation du phosphore tout en ayant une très faible dissolution de la goethite. La solution d'oxalate a un ratio plus faible de $1,4 \text{ mmol P mmol}^{-1} \text{ Fe}$, tandis que l'ascorbate en possède un légèrement plus élevé de $5,3$. La solution d'oxalate permet donc la meilleure co-solubilisation entre le fer et le phosphore en solubilisant en moyenne $1,4$ mole de phosphore pour 1 mole de fer. Les solutions de sidérophores et d'ascorbate viennent ensuite avec $4,7$ et $5,3$ moles de phosphore solubilisé pour chaque mole de fer. La solution de surnageant entraîne une solubilisation de $47,9$ moles de phosphore pour seulement 1 mole de fer. Ces résultats montrent que différents mécanismes de solubilisation du phosphore entrent en jeu.

La solution de surnageant va donc toucher aux ions phosphates adsorbés sur la goethite sans solubiliser le fer de la goethite. En effet, à pH 6, la solution de surnageant permettait une solubilisation du phosphore plus élevée que les autres solutions, excepté celle de sidérophore. Les molécules présentes dans la solution de surnageant ont donc un plus grand impact sur la solubilisation du phosphore que du fer. Ce résultat pourrait être dû à la non-production de molécules efficace au niveau de la dissolution de la goethite et de la solubilisation du fer. En effet, le milieu de culture du surnageant était riche en fer. La synthèse des molécules spécifiques à la solubilisation du fer n'aurait donc pas été activée, ou faiblement. En effet, les pyoverdines, mais également une partie des acides organiques, les dérivés quinolines, la pyoluteorine, l'HCN ou encore le 2-4, diacetylphloroglucinole sont produits majoritairement en présence d'une carence en fer dans le milieu (Illmer et al., 1992; Budzikiewicz, 1993; Welch et al., 2002; Robin et al., 2008). Ainsi, les molécules produites dans un milieu ne présentant pas de carences auraient plus d'impact sur la solubilisation du phosphore que du fer.

La solution de pyoverdine permet la même solubilisation du phosphore que la solution de surnageant à pH 6 (pas de différence significative). Ce résultat pourrait donc être dû à la présence des mêmes molécules efficaces dans la solubilisation du phosphore. Cependant, la solution de pyoverdine engendre également une plus grande solubilisation du fer que l'ensemble des autres solutions, excepté la solution d'oxalate. Ainsi, son plus faible ratio que celui du surnageant est expliqué par une grande solubilisation du fer, due à la présence de molécules efficaces dans l'acquisition du fer, principalement les pyoverdines. Celles-ci engendrent alors une dissolution de la goethite par échange de ligands en se complexant aux ions ferriques à la place des ions phosphates, ce dernier étant alors co-solubilisé. En plus, les ions phosphates peuvent être solubilisés par d'autres molécules efficaces dans la solubilisation du phosphore.

La solution d'oxalate a le plus petit ratio. En effet, la solution d'oxalate entraîne une dissolution de la goethite et donc une solubilisation du fer plus importante que les solutions d'ascorbate et surnageant et semblable à la solution de pyoverdine. Cependant, la solubilisation du phosphore est très faible, semblable à la solution d'ascorbate. Ainsi, son ratio est plus faible que celui de la solution de pyoverdine en raison d'une plus faible solubilisation en phosphore malgré une solubilisation en fer semblable. Elle est également plus faible que le ratio de surnageant en raison

d'une plus grande solubilisation en fer et une plus faible solubilisation en phosphore que la solution de surnageant. La solution d'oxalate permet ainsi la même et une forte dissolution de la goethite également par échanges de ligands avec les ions phosphates que les pyoverdines. Cependant, la solubilisation en phosphore est moins élevée, car l'oxalate est la seule molécule présentant en effet sur la dissolution du phosphore, contrairement aux solutions de surnageant et de pyoverdine ou d'autres molécules peuvent également avoir un effet positif sur la solubilisation du phosphore.

La solution d'ascorbate ne présente pas d'effet supérieur sur la solubilisation en fer et en phosphore que la solution d'eau pure, montrant l'inefficacité de l'ascorbate dans ces conditions. En effet, l'ascorbate est capable d'entraîner une dissolution de la goethite par réduction des ions ferriques et ainsi co-solubiliser les ions phosphates. Cependant, l'ascorbate n'est pas un fort complexant. La présence d'ions phosphates à la surface de la goethite a dès lors entraîné une inhibition de la dissolution réductive. De plus, la dissolution réductive diminue drastiquement au-dessus de pH 6 (Reyes et al., 1997).

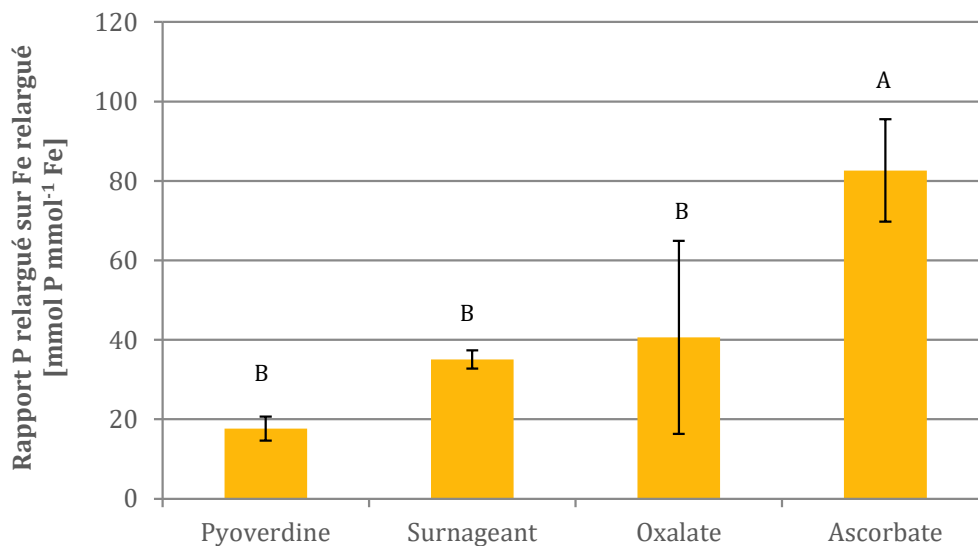


Figure 39. Ratio de la quantité de phosphore soluble relargué sur la quantité de fer soluble relargué de la goethite sorbée à pH 8 après 24 h. Le résultat du test de Tukey est représenté par des lettres. Les moyennes après 24 h qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes.

À pH 8, le ratio de la solution d'ascorbate est très hautement significativement plus élevé ($p < 0,001$) que les autres ratios qui ne présentent pas de différences significatives entre eux ($p > 0,05$). Les ratios les plus faibles sont ceux de la solution de pyoverdine, de surnageant et d'oxalate avec 17,7, 35 et 40,6 moles de phosphore par mole de fer. Enfin, l'ascorbate a le plus grand ratio avec 82 moles de phosphore par mole de fer.

Les ratios des solutions d'oxalate et d'ascorbate sont significativement plus élevés ($p < 0,001$) à pH 8 qu'à pH 6 en raison d'une plus grande quantité de phosphore solubilisé à pH 8 qu'à pH 6 ainsi qu'une plus faible quantité de fer solubilisé au niveau de la solution d'oxalate à pH 8 qu'à pH 6. Les ratios des solutions de pyoverdine et de surnageants ne présentent pas de différences significatives ($p > 0,05$). En effet, la solution de surnageants entraîne la même solubilisation du fer

et du fer à pH 6 qu'à pH 8. La solution de pyoverdine entraîne une solubilisation du fer plus faible et une solubilisation du phosphore plus importante à pH 8, mais ces différences ne permettent pas d'atteindre un ratio significativement différent. Ainsi, le pH aurait un effet moindre sur le ratio des solutions de pyoverdine et de surnageant.

5. Réponses aux besoins des plantes

L'analyse des teneurs en phosphore biodisponible, en phosphates de fer et en fer total d'un sol ayant subi différents régimes de fertilisations dans le cadre d'un essai centenaire a été effectuée par Clémence Bruwier. Les résultats obtenus sont montrés au tableau 11.

Tableau 11. Résultats de Clémence B. représentant les teneurs en phosphore biodisponible, en phosphates de fer ainsi qu'en fer total [mg.100 g⁻¹] dans l'horizon 0-25 cm de parcelles sous fertilisation azote, phosphore, potassium (NPK) ou sous aucune fertilisation (O)

	Données	NPK	O
P biodisponible [mg.100g ⁻¹]	moyenne	9,28	7,32
	écart-type	0,45	0,40
Phosphates de fer [mg.100g ⁻¹]	moyenne	31,78	27,11
	écart-type	3,00	3,60
P total [mg.100g ⁻¹]	moyenne	93,49	78,72
	écart-type	7,79	5,66

Pour un sol ayant subi une fertilisation classique azote, phosphore, potassium (NPK) ainsi qu'un sol n'ayant subi aucune fertilisation (O) durant 100 ans, le stock de phosphore lié au fer (phosphates de fer) s'élève à 31,78 et 27,11 mg.100 g⁻¹ de sol; ce qui représente 34 et 34,4 % du phosphore total dans le sol.

La fraction de phosphore biodisponible est de 9,28 et 7,32 mg.100 g⁻¹ dans les sols ayant subis respectivement une fertilisation NPK et O, ce qui représente 9,92 et 9,3 % du phosphore total des sols. Une teneur en phosphore supérieur à 4,6 mg P.100 g⁻¹ est nécessaire pour les cultures (Genot et al., 2009). Dans le sol NPK ainsi que dans le sol O n'ayant reçu aucun input, des valeurs optimales en phosphore biodisponible pour la croissance et le développement des cultures sont donc présentes. Cependant, au sud de la Wallonie, une grande partie du territoire présente des teneurs trop faibles en phosphore biodisponible pour assurer la bonne croissance et le bon développement des cultures (Genot et al., 2012).

La solution de pyoverdine, dans les conditions de ce travail, a permis de solubiliser 82,4 % à pH 6 et 107,2 % à pH 8 des ions phosphates adsorbés au niveau de la goethite.

En émettant l'hypothèse que l'effet de la solution de pyoverdines est le même sur les phosphates de fer présents dans le sol que sur les phosphates adsorbés à la surface de la goethite, 26,18 et 22,38 mg P.100 g⁻¹ à pH 6 et 31,78 et 27,11 mg P.100 g⁻¹ à pH 8 seraient solubilisés, respectivement pour les sols ayant subis une fertilisation NPK et O. En pourcentage, ces chiffres représentent une solubilisation de 28 et 28,4 % à pH 6 et de 34 et 34,4% du phosphore total présent au niveau du premier horizon du sol, respectivement pour les sols NPK et O.

L'ajout de la solution de pyoverdine pourrait donc permettre de multiplier les teneurs en phosphore biodisponible par 3,82 et 4,06 à pH 6, respectivement dans un sol subissant une fertilisation NPK ou aucune fertilisation. À pH 8, l'ajout de la solution de pyoverdine pourrait engendrer une concentration en phosphore biodisponible de 4,42 et 4,7 fois plus élevée, respectivement dans un sol dans un sol subissant une fertilisation NPK ou aucune fertilisation.

Afin d'analyser uniquement l'impact de la pyoverdine, l'effet de la solution de surnageant sur la solubilisation du phosphore est soustrait à l'effet de la solution de pyoverdine. Ainsi, l'effet d'une de pyoverdine purifiés hypothétique est obtenu. La pyoverdine seule serait capable de solubiliser 10,6 % et 68,7 % des ions phosphates adsorbés à la surface de la goethite. En suivant le même raisonnement que précédemment, la pyoverdine permettrait de solubiliser 3,37 et 2,87 mg.100 g⁻¹ à pH 6 ainsi que 21,83 et 18,62 mg P.100 g⁻¹ à pH 8, respectivement dans des sols ayant subis une fertilisation NPK et O. Ces chiffres représentent une solubilisation de 3,6 et 3,64 % à pH 6 et de 23,55 et 23,65% à pH 8 du phosphore total, respectivement pour les sols NPK et O. L'ajout d'une solution de pyoverdine pure permettrait de multiplier les teneurs en phosphore biodisponible par 1,36 et 1,39 à pH 6 et par 3,36 et 3,54 à pH 8, respectivement dans les sols ayant subi avec fertilisation NPK et O durant 100 ans.

Cependant, ces résultats ne sont que théoriques et doivent être interprétés avec précaution. En effet, plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'obtenir ces résultats. La première hypothèse est que l'ensemble des phosphates de fer se solubilise de la même façon et dans les mêmes conditions que l'expérimentation réalisée dans ce travail. La deuxième hypothèse est que l'ensemble du phosphore solubilisé par l'action des pyoverdines est biodisponible pour les plantes. Or, les caractéristiques des sols influencent la chimie du sol et les réactions ne seront donc pas les mêmes qu'en présence exclusive de goethite synthétique. De plus, le phosphore présent dans les sols peut être sous d'autres formes qu'adsorbées à la goethite et l'effet des pyoverdines sur leur co-solubilisation ne sera donc pas le même. Le phosphore peut par exemple être co-précipité avec le fer. Sous cette forme, le fer est beaucoup moins accessible à l'action des pyoverdines. Les pyoverdines pourraient donc se comporter différemment lorsqu'ils sont appliqués à un sol réel, notamment en allant solubiliser d'autres formes de fer que les phosphates de fer. Enfin, les ions phosphates solubilisés peuvent rapidement être rendu indisponible pour les plantes par des réactions d'adsorption ou de précipitation en conditions réelles.

VI. Conclusion et perspectives

Les objectifs principaux de ce travail étaient d'étudier l'effet des sidérophores sur la dissolution des oxydes de fer ainsi que d'évaluer l'impact de cette dissolution sur la solubilisation de fer ainsi que sur la co-solubilisation du phosphore. Afin d'y répondre, plusieurs étapes ont été nécessaires. Tout d'abord, différents protocoles de production de goethite, oxyde de fer synthétique, ont été appliqués afin d'obtenir une goethite la plus pure possible. La goethite a ensuite été caractérisée au niveau de sa morphologie, de son point de charge nulle, de sa surface spécifique ainsi que de sa composition élémentaire. Une adsorption d'ions phosphates à la surface de la goethite a été réalisée à pH 6 et 8. Les sidérophores utilisés dans cette expérimentation sont uniquement les pyoverdines produites par *Pseudomonas putida BTP1*. Différentes concentrations en fer dans le milieu de culture Casamino Acid ont permis d'obtenir des surnageants de culture présentant des concentrations différentes en pyoverdine. La production de pyoverdine a fait l'objet de plusieurs expérimentations afin de la maximiser mais cette dernière doit encore être améliorée. Les solutions de pyoverdine et de surnageant à pH 6 et 8 ont été appliquées à la goethite, pure ou sorbée avec des ions phosphates, durant 8, 12 et 24 h. La même expérience a été réalisée avec des solutions d'oxalate et d'ascorbate afin de comparer leurs effets.

Suite à l'analyse des concentrations en fer et en phosphore solubilisé, plusieurs grandes tendances ont été mises en évidence. Parmi l'ensemble des solutions, les résultats suggèrent que la solution de pyoverdine est la plus efficace au niveau de la dissolution de la goethite et donc de la solubilisation du fer plus élevée que les autres solutions (surnageant, oxalate et ascorbate). En effet, la solution de pyoverdine présente une concentration en fer soluble plus élevée pour l'ensemble des modalités, excepté au niveau de la goethite sorbée à pH 6 où la solution d'oxalate a une concentration semblable. L'efficacité des pyoverdines à dissoudre la goethite diminue avec l'augmentation du pH ainsi qu'avec la présence d'ions phosphates à la surface de la goethite. La solution de pyoverdine permet une dissolution de la goethite plus élevée à pH 6 qu'à pH 8 et en absence d'ions phosphates pour toutes les modalités.

Les résultats montrent que les pyoverdines permettent une plus grande co-solubilisation de phosphore que les autres solutions. En effet, la concentration en phosphore est plus élevée dans la solution de pyoverdine et de surnageant à pH 6 et uniquement dans la solution de pyoverdine à pH 8 que dans les autres solutions. De plus, l'augmentation du pH de 6 à 8 entraîne une plus grande co-solubilisation du phosphore dans la solution de pyoverdine ainsi que dans les autres solutions, excepté celle de surnageant. Cependant, les pyoverdines n'ont une action directe que sur la dissolution de la goethite qui est réduite à pH 8. Ainsi, la plus grande solubilisation du phosphore à pH 8 ne semble pas être directement liée à l'action des pyoverdines mais à des considérations électrostatiques entre la surface de la goethite et les ions phosphates.

Les solutions ne présentent pas les mêmes ratios de quantité de phosphore solubilisé par quantité de fer solubilisé. Ainsi, différents mécanismes de solubilisation du fer et du phosphore semblent se produire en fonction des solutions d'extractions appliquées à la goethite. Les principaux mécanismes sont le plus vraisemblablement la dissolution de la goethite par échange de ligands pour les pyoverdines et l'oxalate ainsi que la dissolution réductive pour l'ascorbate.

La solution de surnageant à un grand impact sur la solubilisation du phosphore malgré une très faible dissolution de la goethite. La présence de composés ayant un impact sur la solubilisation du phosphore pourrait expliquer cet effet.

En appliquant les résultats obtenus aux phosphates de fer contenu au niveau du sol agricole étudié par Clémence Bruwier, la solution de pyoverdine pourrait multiplier les teneurs en phosphore disponible jusqu'à 4 fois à pH 6 et jusqu'à 4,7 fois à pH 8.

En conclusion, les pyoverdines permettent une dissolution de la goethite ainsi qu'une co-solubilisation du phosphore efficace à des pH proche de la neutralité, généralement retrouvé dans les sols agricoles. Les pyoverdines pourraient alors constituer une des stratégies envisageables afin de réduire l'utilisation des fertilisants phosphatés tout en gardant une concentration en phosphore biodisponible optimale pour les plantes.

Cependant, l'ensemble des résultats doit être interprété avec précaution. En effet, l'effet des pyoverdines, provenant d'une seule souche, sur un seul type d'oxyde de fer synthétique, la goethite en contact permanent avec les solutions chélatantes ne peut pas être appliquée à des conditions réelles. Afin de s'en rapprocher, plusieurs étapes sont nécessaires. Tout d'abord, différents types de sidérophores purifiés d'espèces variées devraient être testés afin de déterminer les plus efficaces. L'effet de ces différents sidérophores doit être testé sur des matrices ferreuses différentes comme d'autres oxydes de fer. Ensuite, les sidérophores devraient être testés au niveau de sols réels afin de voir leur impact sur des matrices plus complexes. En effet, d'autres particules du sol que les oxydes de fer peuvent influencer la biodisponibilité du fer et du phosphore relargué. Le phosphore relargué par l'action des sidérophores peut alors être rapidement fixé par précipitation ou adsorption par d'autres particules du sol ou encore par la biomasse elle-même (Menezes-Blackburn et al., 2018). Les sidérophores doivent être appliqués à différents types de sol, car le taux de désorption du phosphore est dépendant des caractéristiques du sol comme sa minéralogie, son pH, son taux de matière organique ou encore sa diversité biologique (Giles et al., 2017). De plus, l'effet des sidérophores purifiés appliqués directement au sol n'est pas le même que l'effet de l'inoculation des bactéries produisant ces sidérophores. Ainsi, l'inoculation des souches de bactéries au sein des sols est une étape critique dans la détermination de l'effet des sidérophores sur la mobilisation du fer et du phosphore en conditions réelles. Pour terminer, des expérimentations avec des plantes devraient être réalisées, avec les sidérophores purifiés et l'inoculation des bactéries, afin d'en voir l'impact sur le prélèvement du fer et du phosphore par la plante. En effet, le but est d'améliorer le prélèvement du fer et du phosphore par la plante afin de garantir une croissance et un développement optimal.

Certains modèles de simulation ont permis de déterminer que le stock de phosphore indisponible présent dans les sols pourrait permettre de réduire l'utilisation des fertilisants phosphatés de 50 % d'ici à 2050 (Sattari et al., 2012). Ainsi, les stratégies de mobilisation du phosphore déjà présent dans les sols semblent être les plus pertinentes afin de rendre l'agriculture plus durable et respectueuse de l'environnement.

L'ajout d'inoculant bactériens est une des stratégies les plus étudiées et de nombreux produits ont déjà été commercialisés (Owen et al., 2015). Cependant, une attention particulière doit être portée sur les effets de l'inoculation de bactéries exogènes. Ces bactéries peuvent entrer en compétition avec celles naturellement présentes et ainsi diminuer la diversité microbienne des sols, pouvant engendrer des effets négatifs sur la croissance et le développement des sols. De plus, cette stratégie présente certains désavantages comme un impact limité sur la croissance et le développement des plantes des inoculant, une spécificité des inoculant a utilisé en fonction des cultures et du type de sol ou encore une colonisation inefficace de la rhizosphère avec un faible de taux de survie (Martinez et al., 2010).

Cependant, les sidérophores étudiés dans ce travail ne se concentrent que sur la mobilisation du phosphore inorganique fixé avec du fer et devront donc être combinés à d'autres stratégies. Les principales stratégies retrouvées dans la littérature sont les suivantes : l'utilisation de phosphatases afin de minéraliser le phosphore organique (Menezes-Blackburn, Inostroza, et al., 2016), la réduction de l'apport de fertilisants phosphatés afin d'entraîner une désorption et une solubilisation du phosphore par des réactions d'équilibre avec la solution du sol (Menezes-Blackburn, Zhang, et al., 2016), l'utilisation d'amendements capables d'altérer la surface des particules (Guppy et al., 2005), l'inoculation de bactéries et de champignons capables de promouvoir la mobilisation du phosphore (Owen et al., 2015) ainsi qu'une utilisation plus raisonnée des fertilisants (Menezes-Blackburn et al., 2018).

Bibliographie

- Achat D.L., Morel C., Bakker M.R., Augusto L., Pellerin S., Gallet-Budynek A. & Gonzalez M., 2010. Assessing turnover of microbial biomass phosphorus: Combination of an isotopic dilution method with a mass balance model. *Soil Biol. Biochem.* **42**(12), 2231–2240.
- Ahmed E. & Holmström S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microb. Biotechnol.* **7**(3), 196–208.
- Amarasiri S.L. & Olsen S.R., 1973. Liming as Related to Solubility of P and Plant Growth in an Acid Tropical Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **37**, 716–721.
- Ams D.A., Maurice P.A., Hersman L.E. & Forsythe J.H., 2002. Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chem. Geol.* **188**(3–4), 161–170.
- Antelo J., Avena M., Fiol S., López R. & Arce F., 2005. Effects of pH and ionic strength on the adsorption of phosphate and arsenate at the goethite-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* **285**, 476–486.
- Atkinson R.J., Posner A.M. & Quirk J.P., 1967. Adsorption of potential-determining ions at the ferric oxide-aqueous electrolyte interface. *J. Phys. Chem.* **71**(3), 550–558.
- Baggt A. & Neilands J.B., 1987. Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**(4), 509–518.
- Banik S. & Dey B.K., 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant Soil* **69**, 353–364.
- Barrow N.J., 1985. Reactions of anions and cations with variable-charge soils. *Adv. Agron.* **38**, 183–230.
- Barrow N.J., 2015. A mechanistic model for describing the sorption and desorption of phosphate by soil. *Eur. J. Soil Sci.* **66**(1), 9–18.
- Batjes N.H., 1997. A world dataset of derived soil properties by FAO-UNESCO soil unit for global modelling. *Soil Use Manag.* **13**(1), 9–16.
- Beever R.E. & Burns D.J.W., 1981. Phosphorus Uptake, Storage and Utilization by Fungi. *Adv. Bot. Res.* **8**(C), 127–219.
- Bennett P.C., Rogers J.R. & Choi W.J., 2001. Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology. *Geomicrobiol. J.* **18**(May 2012), 3–19.
- Biber M. V., Dos Santos Afonso M. & Stumm W., 1994. The coordination chemistry of weathering: IV. Inhibition of the dissolution of oxide minerals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**(9), 1999–2010.
- Biessy A., Novinscak A., Josic D., Cazorla F.M., Filion M., Léger G., Blom J. & Thomashow L.S., 2019. Diversity of phytobeneficial traits revealed by whole-genome analysis of worldwide-isolated phenazine-producing *Pseudomonas* spp. *Environ. Microbiol.* **21**, 437–455.
- Borgaard O.K., 1983. The influence of iron oxides on phosphate adsorption by soil. *J. Soil Sci.* **34**(2), 333–341.
- Bou-Abdallah F., 2010. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *BBA - Gen. Subj.*

1800, 719–731.

- Boukhalfa H. & Crumbliss A.L., 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **15**, 325–339.
- Braud A., Hoegy F., Jezequel K., Lebeau T. & Schalk I.J., 2009. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* **11**(5), 1079–1091.
- Braun J.C.A., Borba C.E., Godinho M., Perondi D., Schontag J.M. & Wenzel B.M., 2019. Phosphorus adsorption in Fe-loaded activated carbon: Two-site monolayer equilibrium model and phenomenological kinetic description. *Chem. Eng. J.* **361**(September 2018), 751–763.
- Briat J.-F., 2009. Iron assimilation storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **138**(12), 2475–2483.
- Brunauer S., Emmett P.H. & Teller E., 1938. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**(2), 309–319.
- Budzikiewicz H., 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* **104**(3–4), 209–228.
- Budzikiewicz H., 2004. Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas* spp.). In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Vienna, Vienna, 81–237.
- Bünemann E.K., 2008. Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biol. Biochem.* **40**(9), 2116–2129.
- Calvete T., Lima E.C., Cardoso N.F., Dias S.L.P. & Pavan F.A., 2009. Application of carbon adsorbents prepared from the Brazilian pine-fruit-shell for the removal of Procion Red MX 3B from aqueous solution-Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. *Chem. Eng. J.* **155**(3), 627–636.
- Certini G., Campbell C.D. & Edwards A.C., 2004. Rock fragments in soil support a different microbial community from the fine earth. *Soil Biol. Biochem.* **36**(7), 1119–1128.
- Cervini-Silva J. & Sposito G., 2002. Steady-State Dissolution Kinetics of Aluminum-Goethite in the Presence of Desferrioxamine-B and Oxalate Ligands. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 337–342.
- Cezard C., Farvacques N. & Sonnet P., 2014. Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Curr. Med. Chem.* **22**(2), 165–186.
- Chang S.C. & Jackson M.L., 1958. Soil Phosphorus Fractions in Some Representative Soils. *J. Soil Sci.* **9**(1), 109–119.
- Chaudhary D.Y., Gosavi P. & Durve-Gupta A., 2017. Isolation and application of siderophore producing bacteria. *Int. J. Adv. Res.* **3**(4), 246–250.
- Cheah S.-F., Kraemer S.M., Cervini-Silva J. & Sposito G., 2003. Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. *Chem. Geol.* **198**(1–2), 63–75.
- Cornelis P., 2008. Unexpected interaction of a siderophore with aluminum and its receptor. *J. Bacteriol.* **190**(20), 6541–3.
- Cosgrove D.J., Irving G.C.J. & Bromfield S.M., 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. The isolation of soil bacteria having inositol phosphate phosphatase activity. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**(2), 339–344.

- Cowart R.E., 2002. Reduction of iron by extracellular iron reductases: Implications for microbial iron acquisition. *Arch. Biochem. Biophys.* **400**(2), 273–281.
- Cross A.F. & Schlesinger W.H., 1995. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma* **64**(3–4), 197–214.
- Dalal R.C., 1977. Soil Organic Phosphorus. *Adv. Agron.* **29**(1966), 83–117.
- Dave B.P. & Dube H.C., 2000. Regulation of siderophore production by iron Fe(III) in certain fungi and fluorescent pseudomonads. *Indian J. Exp. Biol.* **38**(3), 297–9.
- Davies P.J., 2010. *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!*, Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!, 1–802.
- Demain A.L., Newcomb M., Wu J.H.D., Demain A.L., Newcomb M. & Wu J.H.D., 2005. Cellulase, Clostridia, and Ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**(1), 124–154.
- Devau N., Cadre E. Le, Hinsinger P., Jaillard B. & Gérard F., 2009. Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Appl. Geochemistry* **24**(11), 2163–2174.
- Diaz R.J. & Rosenberg R., 2008. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science (80-.)*. **321**(5891), 926–929.
- Douglas S. & Beveridge T.J., 1998. Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**(2), 79–88.
- Duff R.B. & Webley D.M., 1959. 2-ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. *Chem. Ind.* 1376–1377.
- Earl K.D., Syers J.K. & McLaughlin J.R., 1979. Origin of the Effects of Citrate, Tartrate, and Acetate on Phosphate Sorption by Soils and Synthetic Gels¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**(4), 674.
- FAO, 2018. L'état de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde. *L'état la sécurité Aliment. la Nutr. le monde - 2018*. <http://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/fr/>, (22/06/2019).
- Fardeau S., Mullié C., Audic N., Sasaki A. & Sonnet P., 2011. Bacterial iron uptake : a promising solution against multidrug resistant bacteria. *In: Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. 695–705.
- Fernández-baca C.P., 2010. Investigation of the effect of phosphate on iron (ii) sorption to iron oxides.
- Fresco L., 2003. Focus: Les engrais et l'avenir. *La sécurité Aliment. Mond. le rôle la Fertil. durable*. <http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0306sp1.htm>, (24/07/2019).
- Furrer G. & Stumm W., 1986. The coordination chemistry of weathering: I. Dissolution kinetics of δ -Al₂O₃ and BeO. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**(9), 1847–1860.
- Gálvez N., Barrón V. & Torrent J., 1999. Effect of phosphate on the crystallization of hematite, goethite, and lepidocrocite from ferrihydrite. *Clays Clay Miner.* **47**(3), 304–311.
- Genot V., Colinet G., Brahy V. & Bock L., 2009. L'état de fertilité des terres agricoles et forestières en région wallonne (adapté du chapitre 4 - sol 1 de « L'État de l'Environnement wallon 2006-2007 »). *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* **13**(1), 121–138.

- Genot V., Renneson M., Colinet G., Goffaux M.-J., Cugnon T., Toussaint B., Buffer D. & Oger R., 2012. Base de données sols de REQUASUD 3ème synthèse, 36.
- Giles C.D., George T.S., Brown L.K., Mezeli M., Shand C.A., Richardson A.E., Mackay R., Wendler R., Darch T., Menezes-Blackburn D., Cooper P., Stutter M.I., Lumsdon D.G., Blackwell M.S.A., Wearing C., Zhang H. & Haygarth P.M., 2017. Linking the depletion of rhizosphere phosphorus to the heterologous expression of a fungal phytase in *Nicotiana tabacum* as revealed by enzyme-labile P and solution ^{31}P NMR spectroscopy. *Rhizosphere* **3**, 82–91.
- Goldstein A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* **1**(2), 51–57.
- Goldstein A.H., 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate Microorg. Cell. Mol. Biol.* 197–203.
- Goldstein A.H., Braverman K. & Osorio N., 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**(4), 295–300.
- Greaves M.P. & Webley D.M., 1965. A Study of the Breakdown of Organic Phosphates by Microorganisms from the Root Region of Certain Pasture Grasses. *J. Appl. Bacteriol.* **28**(3), 454–465.
- Guerinot M. Lou & Yi Y., 1994. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol* **104**, 815–820.
- Gugi B., Orange N., Hellio F., Burini J.F., Guillou C., Leriche F. & Guespin-Michel J.F., 1991. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **173**(12), 3814–3820.
- Guppy C.N., Menzies N.W., Moody P.W. & Blamey F.P.C., 2005. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: A review. *Aust. J. Soil Res.* **43**(2), 189–202.
- Halder A.K., Mishra A.K., Bhattacharyya P., Chakrabartty P.K. & Road A.P.C., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Gen. Appl. Microbiol.* **92**(36), 81–92.
- Havlin J.L., Tisdale S.L., Nelson W.L. & Beaton J.D., 2013. *Soil fertility and fertilizers*. Pearson ed., 528.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R. & Ahmed I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann. Microbiol.* **60**(4), 579–598.
- Hersman L., Lloyd T. & Sposito G., 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **59**(16), 3327–3330.
- Hersman L., Maurice P. & Sposito G., 1996. Iron acquisition from hydrous Fe(III)-oxides by an aerobic *Pseudomonas* sp. *Chem. Geol.* **132**(1–4), 25–31.
- Hersman L.E., 2000. The Role of Siderophores in Iron Oxide Dissolution. In: *Environmental Microbe-Metal Interactions*. 145–157.
- Hinsinger P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes : a review. *Plant Soil* **237**, 173–195.
- Hinsinger P., Plassard C., Tang C. & Jaillard B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* **248**, 43–59.

- Holmen B.A. & Casey W.H., 1996. Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand- promoted dissolution of goethite [a-FeOOH(s)]. *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**(22), 726.
- Huber D., 2005. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small* **1**(5), 482–501.
- Hue N. V., Craddock G.R. & Adams F., 1986. Effect of Organic Acids on Aluminum Toxicity in Subsoils1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **50**(1), 28.
- Illmer P. & Schinner F., 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**(4), 389–395.
- Jacques P., Ongena M., Gwose I., Seinsche D., Schröder H., Delfosse P., Budzikiewicz H., Thonart P. & Taraz K., 1995. Structure and Characterization of Isopyoverdin from *Pseudomonas putida* BTP1 and Its Relation to the Biogenetic Pathway Leading to Pyoverdins. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **50c**, 622–629.
- Jones D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant Soil* **205**, 25–44.
- Jones D.L., Kochian L., Jones D.L., Darrah P.R. & Kochian L. V, 1996. Critical Evaluation of Organic Acid Mediated Iron Dissolution in the Rhizosphere and Its Potential Role in Root Iron Uptake. *Plant Soil* **180**, 57.
- Kalinowski B.E., Liermann L.J., Givens S. & Brantley S.L., 2000. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chem. Geol.* **169**(3–4), 357–370.
- Khan M.S., Zaidi A. & Wani P.A., 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agron. Sustain. Dev* **27**, 29–43.
- Kirchner M.J., Wollum II A.G. & King L.D., 1993. Soil Microbial Populations and Activities in Reduced Chemical Input Agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **57**, 1289–1295.
- Kosmulski M., Durand-Vidal S., Maczka E. & Rosenholm J.B., 2004. Morphology of synthetic goethite particles. *J. Colloid Interface Sci.* **271**(2), 261–269.
- Kosmulski M. & Maczka E., 2003. Synthesis and characterization of goethite and goethite – hematite composite : experimental study and literature survey. *Adv. Colloid Interface Sci.* **103**, 57–76.
- Kosmulski M., Saneluta C. & Maczka E., 2003. Electrokinetic study of specific adsorption of cations on synthetic goethite. *Colloids and Surfaces* **222**, 119–124.
- Kraemer S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci.* **66**(1), 3–18.
- Kraemer S.M., Cheah S.-F., Zapf R., Xu J., Raymond K.N. & Sposito G., 1999. Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**(19–20), 3003–3008.
- Kraemer S.M., Crowley D.E. & Kretschmar R., 2006. Geochemical Aspects of Phytosiderophore-Promoted Iron Acquisition by Plants. *Adv. Agron.* **91**(06), 1–46.
- Kraemer S.M. & Hering J.G., 1997. Influence of solution saturation state on the kinetics of ligand-controlled dissolution of oxide phases. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**(14), 2855–2866.
- Krasilnov N., 1961. On the Role of Soil Bacteria in Plant Nutrition. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **7**(2),

128–144.

- Krumina L., Kenney J.P.L., Loring J.S. & Persson P., 2016. Desorption mechanisms of phosphate from ferrihydrite and goethite surfaces. *Chem. Geol.* **427**, 54–64.
- Lan M., Comerford N.B. & Fox T.R., 1995. Organic Anions' Effect on Phosphorus Release from Spodic Horizons. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**, 1745–1749.
- Leong J., 1986. Siderophores : their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol* **24**, 187–209.
- Liermann L.J., Kalinowski B.E., Brantley S.L. & Ferry J.G., 1999. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**(4), 587–602.
- Lindsay W.L., 1980. Chemical Equilibria in Soils. *Clays Clay Miner.* **28**(4), 319–319.
- Lindsay W.L. & Schwab A.P., 1982. The Chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* **5**(4–7), 821–840.
- Liu H., Chen T. & Frost R.L., 2014. An overview of the role of goethite surfaces in the environment. *Chemosphere* **103**, 1–11.
- Lucena J.J., 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* **23**(11–12), 1591–1606.
- Martinez O.A., Jorquera D.E., Crowley D.E., Gajardo G. & Mora M.L., 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**(3), 293–319.
- McLaughlin J.R., Ryden J.C. & Syers J.K., 1981. Sorption of Inorganic Phosphate By Iron and Aluminium Containing Components. *J. Soil Sci.* **32**(3), 365–378.
- McNamara C.J., Perry IV T.D., Bearce K.A., Hernandez-Duque G. & Mitchell R., 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb. Ecol.* **51**(1), 51–64.
- Menezes-Blackburn D., Giles C., Darch T., George T.S., Blackwell M., Stutter M., Shand C., Lumsdon D., Cooper P., Wendler R., Brown L., Almeida D.S., Wearing C., Zhang H. & Haygarth P.M., 2018. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. *Plant soil* **427**, 5–16.
- Menezes-Blackburn D., Inostroza N., Gianfreda L., Greiner R., Mora M. & Jorquera M., 2016. Phytase-producing *Bacillus* sp. inoculation increases phosphorus availability in cattle manure. *J. soil Sci. plant Nutr.* **16**(1), 200–210.
- Menezes-Blackburn D., Zhang H., Stutter M., Giles C.D., Darch T., George T.S., Shand C., Lumsdon D., Blackwell M., Wearing C., Cooper P., Wendler R., Brown L. & Haygarth P.M., 2016. A Holistic Approach to Understanding the Desorption of Phosphorus in Soils. *Environ. Sci. Technol.* **50**(7), 3371–3381.
- Meyer J.-M., Gruffaz C., Raharinosy V., Bezverbnaya I., Schäfer M. & Budzikiewicz H., 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *BioMetals* **21**(3), 259–271.
- Meyer J.-M., Gruffaz C., Tulkki T., Izard D. & Jean-Marie Meyer C., 2007. Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2543–2556.

- Meyer J.M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* **174**(3), 135–42.
- Meyer J.M. & Abdallah M.A., 1978. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens* : Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319–328.
- Meyer J.M., Azelvandre P. & Georges C., 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Biofactors* **4**(1), 23–7.
- Montes-Hernandez G., Beck P., Renard F., Quirico E., Lanson B., Chiriac R. & Findling N., 2011. Fast Precipitation of Acicular Goethite from Ferric Hydroxide Gel under Moderate Temperature (30 and 70 °C). *Cryst. Growth Des.* **11**, 2264–2272.
- Morel C., Denoroy C., Mollier A. & Pellerin S., 2018. Cycle biogéochimique du phosphore dans les agroécosystèmes. In: comifer ed. *Guide de La Fertilisation Raisonnée*. Editions France Agricole 2017, 130–139.
- Mossialos D., Meyer J.-M., Budzikiewicz H., Wolff U., Koedam N., Baysse C., Anjaiah V. & Cornelis P., 2000. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2), 487–492.
- Nations Unies, 2019. La population | Nations Unies. *La Popul.*
<https://www.un.org/fr/sections/issues-depth/population/index.html>, (22/06/2019).
- Neilands J.B., 1981. Iron Absorption and Transport in Microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* **1**, 27–46.
- Neilands J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**(45), 26723–6.
- Nelson M., Cooper C.R., Szanislo P.J., Crowley D.E. & Reid C.P.P., 1988. An escherichia colibioassay of individual siderophores in soil. *J. Plant Nutr.* **11**(6–11), 915–924.
- Nisha K., Devi P. & Kumari S., 2014. Role of Phosphorous Solubilizing Microorganisms to Eradicate P-Deficiency in Plants: A Review. *Int. J. Sci. Res. Publ.* **4**(7), 1–5.
- Ongena M., 1996. Etude de siderophores de *Pseudomonas fluorescens* en relation avec la lutte biologique.
- Ongena M., Jacques P., Delfosse P. & Thonart P., 2002. Unusual traits of the pyoverdine-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BioMetals* **15**, 1–13.
- Owen D., Williams A.P., Griffith G.W. & Withers P.J.A., 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Appl. Soil Ecol.* **86**(August), 41–54.
- Parani K. & Saha B.K., 2012. Prospects of using phosphate solubilizing *Pseudomonas* as bio fertilizer. *Eur. J. Biol. Sci.* **4**(2), 40–44.
- Parfitt R.L., 1989. Phosphate reactions with natural allophane, ferrihydrite and goethite. *Soil Sci.* **40**, 359–369.
- Parfitt R.L. & Atkinson R.J., 1976. Phosphate adsorption on goethite (α -FeOOH). *Nature* **264**(23), 740–742.
- Parker V.B. & Khodakovskii I.L., 1995. Thermodynamic Properties of the Aqueous Ions (2+ and 3+) of Iron and the Key Compounds of Iron. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24**, 1699.

- Powell P.E., Cline G.R., Reid C.P.P. & Szaniszló P.J., 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature*.
- Raghothama K.G. & Karthikeyan A.S., 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil* **274**(1–2), 37–49.
- Raines D.J., Sanderson T.J., Wilde E.J. & Duhme-Klair A.-K., 2015. Siderophores. *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*
- Ramulu U.S.S., Pratt P.F. & Page A.L., 1967. Phosphorus Fixation by Soils in Relation to Extractable Iron Oxides and Mineralogical Composition1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **31**(2), 193–196.
- Reichard P.U., Kretzschmar R. & Kraemer S.M., 2007. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* **71**(23), 5635–5650.
- Reyes I. & Torrent J., 1997. Citrate-Ascorbate as a Highly Selective Extractant for Poorly Crystalline Iron Oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **61**(6), 1647–1654.
- Richardson A.E. & Simpson R.J., 2011. Update on Microbial Phosphorus Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiol.* **156**, 989–996.
- Robert M. & Berthelin J., 1986. Role of Biological and Biochemical Factors in Soil Mineral Weathering. In: America, S.S.S. of ed. *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. 453–496.
- Robin A., Vansuyt G., Hinsinger P., Meyer J.M., Briat J.F. & Lemanceau P., 2008. Iron Dynamics in the Rhizosphere: Consequences for Plant Health and Nutrition. *Adv. Agron.* **99**, 183–225.
- Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T. & Bashan Y., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* **287**(1–2), 15–21.
- Rodríguez H. & Fraga R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**(4–5), 319–339.
- Römheld V., 1991. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant Soil* **130**, 127–134.
- Römheld V. & Marschner H., 1983. Mechanism of iron uptake by peanut plants : I. Fe reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *Plant Physiol.* **71**(4), 949–94954.
- Ryan P. & Delhaize E., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 527–560.
- Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B.K., Bhattacharjee S. & Tribedi P., 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**(5), 3984–3999.
- Santi S., Cesco S., Varanini Z. & Pinton R., 2005. Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* **43**(3), 287–292.
- Sattari S.Z., Bouwman A.F., Giller K.E. & van Ittersum M.K., 2012. Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**(16), 6348–6353.
- Sayed R.Z., Badgujar M.D., Sonawane H.M., Mhaske M.M. & Chincholkar S.B., 2005. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. *Indian J. Biotechnol.* **4**, 484–490.

- Schalk I.J., Kyslik P., Prome D., Van Dorsselaer A., Poole K., Abdallah M.A. & Pattus F., 1999. Copurification of the FpvA Ferric Pyoverdine Receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with Its Iron-Free Ligand: Implications for Siderophore-Mediated Iron Transport. *Biochemistry* **38**, 9357–9365.
- Schwertmann U., 1988. Some Properties of Soil and Synthetic Iron Oxides. *In: Iron in Soils and Clay Minerals*. Springer Netherlands, München, 203–250.
- Schwertmann U., 1996. Iron oxides. *In: Chesworth, W. ed. Encyclopedia of Soil Science*. 363–369.
- Schwertmann U. & Cornell R.M., 2000. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*, Wiley-VCH, 188.
- Shang C., Stewart J.W.B. & Huang P.M., 1992. pH effect on kinetics of adsorption of organic and inorganic phosphates by short-range ordered aluminum and iron precipitates. *Geoderma* **53**(1–2), 1–14.
- Spasojevic I., Armstrong S.K., Brickman T.J. & Crumbliss A.L., 1999. Electrochemical Behavior of the Fe(III) Complexes of the Cyclic Hydroxamate Siderophores Alcaligin and Desferrioxamine E. *Inorg. Chem.* **38**(3), 1999.
- Sperber J., 2004. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. J. Agric. Res.* **9**(6), 778.
- SPF-Finances, 2016. Évolution des terres agricoles, parcelles bâties et superficies non cadastrées. *Le foncier Agric. face à l'artificialisation des terres en Wallonie - Anal. croisée des données issues du cadastre des données Relat. à la Superf. Agric. utile* **66**, 34.
- Strauss R., Brümmer G.W. & Barrow N.J., 1997. Effects of crystallinity of goethite: I. Preparation and properties of goethites of differing crystallinity. *Eur. J. Soil Sci.* **48**(1), 87–99.
- Takahashi Y., Minai Y., Ambe S., Makide Y., Ambe F. & Tominaga T., 1997. Simultaneous determination of stability constants of humate complexes with various metal ions using multitracer technique. *Sci. Total Environ.* **198**(1), 61–71.
- Tarafdar J.C., Yadav R.S. & Meena S.C., 2001. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *J. plant Nutr. soil Sci.* **164**, 279–282.
- Tiessen H., 2008. Phosphorus in the Global Environment. *J. Ecol.* **84**(4), 631.
- Tiessen H., Stewart J.W.B. & Cole C. V., 1984. Pathways of Phosphorus Transformations in Soils of Differing Pedogenesis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **48**(4), 853.
- Torrent J., Barrón V. & Schwertmann U., 1990. Phosphate Adsorption and Desorption by Goethites Differing in Crystal Morphology. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**(4), 1007.
- Torrent J., Schwertmann U. & Barrón V., 1992. Fast and slow phosphate sorption by goethite-rich natural materials. *Clays Clay Miner.* **40**(1), 14–21.
- Trolard F. & Tardy Y., 1987. The stabilities of gibbsite, boehmite, aluminous goethites and aluminous hematites in bauxites, ferricretes and laterites as a function of water activity, temperature and particle size. *Geochim. Cosmochim. Acta* **51**(4), 945–957.
- Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.-P. & Frey-Klett P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* **17**(8), 378–387.
- Vance G.F., Stevenson F.J. & Sikora F.J., 1996. *The environmental chemistry of aluminum-organic complexes*. Sposito, G. ed., Lewis Publishers, Berkeley, 464.

- Vendramini J.M.B., Silveira M.L.A., Dubeux Jr. J.C.B. & Sollenberger L.E., 2007. Environmental impacts and nutrient recycling on pastures grazed by cattle. *Rev. Bras. Zootec.* **36**, 139–149.
- Villacís-García M., Ugalde-Arzate M., Vaca-Escobar K., Villalobos M., Zanella R., Martínez-Villegas N. & Luis Potosí S., 2015. Laboratory synthesis of goethite and ferrihydrite of controlled particle sizes. *Boletín la Soc. Geológica Mex.* **67**(3), 433–446.
- Villalobos M. & Pérez-Gallegos A., 2008. Goethite surface reactivity: A macroscopic investigation unifying proton, chromate, carbonate, and lead(II) adsorption. *J. Colloid Interface Sci.* **326**, 307–323.
- Visca P., Imperi F. & Lamont I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**(1), 22–30.
- Wang, X., Liu, F., Tan, W., Li, W., Feng, X. & Sparks D.L., 2013. Characteristics of Phosphate Adsorption-Desorption Onto Ferrihydrite. *Soil Sci.* **178**(1), 1–11.
- Welch S.A., Taunton A.E. & Banfield J.F., 2002. Effect of Microorganisms and Microbial Metabolites on Apatite Dissolution. *Geomicrobiol. J.* **19**(3), 343–367.
- Welch S.A. & Ullman W.J., 1993. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**(12), 2725–2736.
- Whitelaw M.A., 1999. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. *Adv. Agron.* **69**, 99–151.
- Winkelmann G., 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* **30**(4), 691–696.
- Yoshida T., Hayashi K. & Ohmoto H., 2002. Dissolution of iron hydroxides by marine bacterial siderophore. *Chem. Geol.* **184**(1–2), 1–9.
- Zahir Z.A., Arshad M. & Frankenberger W.T., 2001. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives In Agriculture. *Adv. Agron.* **81**(03), 97–168.
- Zaidi A., Khan M., Ahemad M. & Oves M., 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **56**(3), 263–284.
- Zaidi A. & Khan M.S., 2007. Stimulatory effects of dual inoculation with phosphate solubilising microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungus on chickpea. *Aust. J. Exp. Agric.* **47**(8), 1016.